



Sveučilište u Zagrebu

ŠUMARSKI FAKULTET

Marno Milotić

**ULOGA GLJIVE *Hymenoscyphus fraxineus*  
(T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya U  
ODUMIRANJU JASENA (*Fraxinus* spp.) U  
REPUBLICI HRVATSKOJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu  
ŠUMARSKI FAKULTET

Marno Milotić

**ULOGA GLJIVE *Hymenoscyphus fraxineus*  
(T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya U  
ODUMIRANJU JASENA (*Fraxinus* spp.) U  
REPUBLICI HRVATSKOJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr. sc. Danko Diminić

Zagreb, 2017



University of Zagreb  
FACULTY OF FORESTRY

Marno Milotić

**THE ROLE OF FUNGUS *Hymenoscyphus  
fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz &  
Hosoya IN ASH DIEBACK (*Fraxinus* spp.)  
IN THE REPUBLIC OF CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Danko Diminić, Ph.D.

Zagreb, 2017

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TI (naslov)	Uloga gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u odumiranju jasena ( <i>Fraxinus</i> spp.) u Republici Hrvatskoj
AU (autor)	Marno Milović
AD (adresa)	Gologorica 1a, 52402 Cerovlje, email: mmilotic@gmail.com
SO (izvor)	Šumarska knjižnica, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Svetošimunska 25, 10000 Zagreb
PY (godina objave)	2017
LA (izvorni jezik)	Hrvatski
DE (ključne riječi)	Nova bolest jasena, <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> , <i>Chalara fraxinea</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Fraxinus angustifolia</i> , fenologija listanja, klonske sjemenske plantaže, osjetljivost klonova, mitovirus HfMV1, mjere kontrole bolesti
GE (zemlja objave)	Republika Hrvatska
PT (vrsta objave)	Doktorska disertacija
VO (obujam)	I – XXI + 290 str. + 52 tablica + 95 slike + 283 literaturna navoda
AB (sažetak)	<p>Obični jasen (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) i poljski jasen (<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl), gospodarski i ekološki vrlo značajne vrste gorskih i nizinskih šuma Hrvatske, u posljednje vrijeme pokazuju sve izraženije simptome odumiranja. Mehanizmi koji dovode do ove pojave još nisu u potpunosti razjašnjeni iako od biotičkih čimbenika novootkriveni gljivični patogen <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz &amp; Hosoya predstavlja najveću neposrednu opasnost ovim sastojinama. Provedeno istraživanje utvrđuje distribuciju i djelovanje patogene gljive <i>H. fraxineus</i>, te njenu sveukupnu ulogu u odumiranju vrsta <i>Fraxinus</i> spp. u gorskim i nizinskim područjima Hrvatske. Istražene su mogućnosti njene biološke kontrole, te rezistentnosti pojedinih genotipova poljskog jasena na djelovanje ovog patogena koje mogu dati doprinos rješavanju ove problematike.</p> <p>Gljivični patogen <i>H. fraxineus</i> prvi je put opisan u Hrvatskoj 2009. godine. Vrlo brzo se etablirao i sustavno proširio na čitav prostor areala rasprostranjenja običnog i poljskog jasena u Hrvatskoj. Bolest nije utvrđena u termofilnim zajednicama na mediteranskom području rasprostranjenja crnog jasena (<i>Fraxinus ornus</i> L.).</p>



Rezultati procjene oštećenosti stabala u sastojinama koreliraju s vremenima pojave plodnih tijela patogena i njegovim infekcijskim potencijalom na pojedinim lokacijama u Hrvatskoj.

Kod djelovanja patogena *H. fraxineus* kao primarnog uzročnika sušenja jasena, prateće vrste gljiva sudjeluju u bržem progresivnom propadanju i narušavanju vitaliteta stabala jasena.

Utvrđeno je da niske temperature djeluju inhibitorno na rast izolata gljive *H. fraxineus*, dok visoke temperature djeluju inhibitorno i sterilizirajuće. Temperatura od 30 °C je izazvala mortalitet 5,5% hrvatskih i čak 60% belgijskih izolata.

Istraživanjem su utvrđena dva glavna morfotipa izolata *H. fraxineus*. Real time qPCR-om za detekciju i identifikaciju gljive *H. fraxineus* u tkivima jasena potvrđen je identitet svih 33 istraživana izolata kao gljivični patogen *H. fraxineus*. Omjeri idiomorfa MAT1:MAT2 kod hrvatskih izolata bili su 2:1, a kod belgijskih izolata 6:1. Tip idiomorfa pokazuje utjecaj vezan za geografsko podrijetlo. Mitovirus HfMV1 pozitivno utvrđeno je u 27,7% hrvatskih i 66,7% belgijskih izolata. Postoji statistički značajna razlika u rasprostranjenosti virusa između populacija, što može biti razlog pojave virulentnijih izolata u Hrvatskoj. RAMS markerima utvrđeno je postojanje dviju populacija s obzirom na genetsku varijabilnost, koje se dalje mogu razgranati na čak sedam subpopulacijskih grupa izolata. Dobivene populacije ne korespondiraju s geografskim podrijetlom izolata (Hrvatska i Belgija). Izolati *H. fraxineus*, ovisno o temperaturi ukazuju značajne razlike u stopi rasta *in vitro* što je pretpostavljeno povezano s genetskom varijabilnošću.

Istraživanje provedeno na tri tipa agar hranjivih medija dokazalo je sposobnost stimulacije rasta izolata patogena s ekstraktima lišća svih autohtonih vrsta jasena. Stope rasta na različitim medijima koreliraju s osjetljivošću vrsta domaćina.

Zabilježeno je da djelovanje UVB i UVA spektra svjetlosti utječe na redukciju rasta i sporulaciju gljive međutim nije uzrokovalo odumiranje izolata. Vidljivi spektar svjetlosti uzrokuje pojačanu reprodukciju gljive.

U testiranjima *in vitro* i *in vivo* potvrđena je glavna uloga temperature na rast gljive i razvoj nekrotičnih lezija na biljkama u prirodi, te da rast nekroza, osim o temperaturi, ovisi i o vrsti domaćina jasena.

Utvrđena je značajna osjetljivost klonova povećanjem progresije bolesti od 97% u prva četiri mjeseca od početka inokulacije, te kontinuirano slamanje svojstva rezistentnosti domaćina pojavom stope mortaliteta od 49% u razdoblju od jedne godine. Niti jedan od testiranih klonova nije ukazao na totalnu rezistentnost prema uzročniku sušenja jasena *H. fraxineus*, međutim nekoliko ih je pokazivalo reduciranu osjetljivost.

Istraživani klonovi su klasirani u rane i kasne fenološke grupe s obzirom na početak listanja, ali i na odbacivanje lista u jesen. Klon NG03 pripada grupi ranih fenotipova listanja i pokazuje tendenciju smanjene osjetljivosti. Dobar klon za nastavak istraživanja osjetljivosti na patogena *H. fraxineus* s obzirom na fenologiju je klon NG31 s obzirom da ima kraći vegetacijski period i smanjenu prosječnu duljinu razvjenih nekroza kore u inokuliranim sadnicama.

Utvrđeno je povećanje vrijednosti kalija i cinka kod zaraženih sadnica poljskog jasena, te smanjene vrijednosti željeza. Najtolerantniji klonovi na infekciju patogenom iz testova osjetljivosti pokazuju smanjene vrijednosti mangana, a povećane vrijednosti cinka.

Hipovirulentnost kod *H. fraxineus* uzrokovana mitovirusom HfMV1 nije neosporno dokazana. Postoji statistički značajna redukcija promjera na svim inficiranim biljkama u odnosu na kontrolnu skupinu neinficiranih sadnica neovisno o prisustvu HfMV1.

U *in vitro* testiranjima rasta i fruktifikacije izolata metodama primjene Allicin sredstva nakon i prije infekcije dokazana je značajna redukcija rasta i fruktifikacije patogena. U *in vivo* testiranjima injektiranjem Allicin sredstva u sadnice poljskog jasena u svrhu zaštite nije potpuno zaustavilo rast nekroza, ali je usporilo daljnju progresiju bolesti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

TI (Title)	The role of fungus <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya in ash dieback ( <i>Fraxinus</i> spp.) in the Republic of Croatia
OT (Original title)	Uloga gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u odumiranju jasena ( <i>Fraxinus</i> spp.) u Republici Hrvatskoj
AU (Author)	Marno Milotić
AD (Address of Author)	Gologorica 1a, 52402 Cerovlje, email: mmilotic@gmail.com
SO (Source)	Library of forestry, Forestry faculty of Zagreb University Svetosimunska 25, 10000 Zagreb
PY (Publication year)	2017
LA (Text language)	Croatian
DE (Descriptors)	Ash dieback disease, <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> , <i>Chalara fraxinea</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Fraxinus angustifolia</i> , leaf phenology, clonal seed orchards, clone susceptibility, mitovirus HfMV1, disease control measures
GE (Geo. Headings)	Republic of Croatia
PT (Publication Type)	Doctoral Thesis
VO (Volume)	I – XXI+ 290 p. + 52 tables + 95 figures + 283 references
AB (Abstract)	<p>Common ash (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) and narrow-leaved ash (<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl), economically and ecologically very important species in mountain and lowland forests of Croatia, have recently developed more prominent decline symptoms. Specific mechanisms which cause this phenomenon are not yet identified, however the newly discovered fungal pathogen <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> represents the highest direct danger for these stands. This research determined the distribution and the function of fungal pathogen <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>, and its overall role in declining <i>Fraxinus</i> spp. in mountain and lowland regions of Croatia. Also the possibility of its biological control, and the susceptibility of seedlings to the infection of this pathogen which could give a contribution to the resolution of this rising problem.</p> <p>Fungal pathogen <i>H. fraxineus</i> was first described in Croatia in 2009. In short period was well established and systematically spread across the whole area</p>

of common and narrow-leaved ash regions. The disease is not present in the thermophilic communities on the Mediterranean prevailing area of manna ash (*Fraxinus ornus* L.).

Damage stand assessments correlated with first pathogen infection appearance and infection potential of the pathogen on the individual locations in Croatia.

The activity of the pathogen *H. fraxineus* as the primary cause of ash dieback was followed with other fungal species that participated in the decline and caused progressive, faster degradation of ash tree vitality.

Low temperatures inhibited the growth of fungal isolates, and high temperatures inhibited and sterilised the *H. fraxineus* isolates. Temperature of 30 °C caused the mortality of 5.5% of Croatian and 60% of Belgian isolates.

Two main morphotypes of fungal isolates *H. fraxineus* were obtained. Real time qPCR for detection and identification of fungus *H. fraxineus* in the ash tissues was used to confirm the identity of 33 isolates. The mating type ratio MAT1:MAT2 was 2:1 in Croatian isolates and 6:1 in Belgian isolates. Mating type ratio shows influence related to geographical origin of isolates. Mitovirus HfMV1 was found in 27.7% of Croatian and 66.7% of Belgian isolates. There was a significant statistical difference in virus prevalence between populations, which could be the reason of more virulent isolate prevalence in Croatia. RAMS markers were used to determine two populations according to genetic variability, which could be subdivided in 7 isolate groups. The populations do not correspond with geographical origin of the isolates (Croatia and Belgium). Isolates of *H. fraxineus* show significant difference *in vitro* in growth rate according to temperature which corresponds to genetic variability.

Research on different types of agar medium with ash leaf extracts provided stimulation of pathogen isolates' growth on all mediums with leaf extracts. Growth rates of isolates on different mediums with leaf extract correlated with the susceptibility of ash host species.

Activity of UVB and UVA light spectrum was strong enough to reduce the growth and fungal sporulation but not enough to cause death. Visible light

spectrum stimulated fungal reproduction battling for survival of the species.

*In vitro* and *in vivo* experiments confirmed the main role of temperature on fungal growth and necrotic lesions development on seedlings in nature, and also that necrosis development, besides the temperature, was directly influenced by ash host species.

Significant susceptibility of clones was established by the increase of disease progression on 97% in just first four months in the inoculation experiment, and the breakage of resistant trait was confirmed on the mortality rate of 49% after one year monitoring period. None of the tested clones showed total resistance to the pathogen *H. fraxineus*, but some of the clones showed reduced susceptibility.

Clones were classified in early and late phenotypic groups according to leaf flushing and leaf shedding. Clone NG03 belongs to the early phenotypic group and has a tendency of reduced susceptibility. Interesting clone for the future research in susceptibility to the pathogen *H. fraxineus* is clone NG31 which revealed shorter vegetative period and reduced average necrosis length.

Leaf analysis of the inoculated seedlings of narrow-leaved ash revealed higher values of potassium and zinc and lower values of iron. The most tolerant clones to the pathogen in the susceptibility trial, revealed lower values of manganese and higher values of zinc.

Hipovirulence in *H. fraxineus* caused by the mitovirus HfMV1 was not indisputably proven in the test. There is statistically significant reduction of seedlings diameter growth on every infected seedling compared to control uninfected seedlings regardless of the mitovirus presence.

*In vitro* tests of isolate growth and fructification by application methods of Allicine biological agent after and before the infection showed significant reduction in growth and fructification of the isolates is possible. *In vivo* tests by injection methods of Allicine agent in infected seedlings of narrow-leaved ash did not fully stopped the necrosis growth, but it slowed down the progression of the disease.

## KAZALO SADRŽAJA

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	I
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO SLIKA .....	XI
KAZALO TABLICA .....	XV
PREDGOVOR I ZAHVALE .....	XVII
PODACI O MENTORU .....	XX
1. UVOD .....	1
1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja.....	7
1.1.1. Raširenost bolesti i oštećenost jasenovih sastojina u Europi .....	8
1.1.2. Gljiva <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> uzročnik odumiranja jasena .....	11
1.1.2.1. Traženje uzročnika sušenja i otkriće nove vrste.....	11
1.1.2.2. Otkriće teleomorfa.....	13
1.1.2.3. Utvrđivanje porijekla gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	14
1.1.3. Razvojni ciklus i simptomi bolesti.....	16
1.1.4. Mogućnosti suzbijanja gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	21
1.1.5. Individualna otpornost jasena .....	26
1.2. Ciljevi i hipoteze istraživanja .....	27
1.3. Područje istraživanja.....	30
2. MATERIJALI I METODE .....	38
2.1. <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske.....	38
2.1.1. Istraživanja prisutnosti patogene gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske .....	38
2.1.1.1. Planiranje pokusa i izbor lokacija za postavljanje istraživačkih ploha .....	38
2.1.1.2. Postavljanje istraživačkih ploha .....	38
2.1.1.3. Sakupljanje, obrada i analiza drvnog tkiva .....	39
2.1.2. Osutost stabala .....	42
2.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena .....	43
2.2. Istraživanja izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	45
2.2.1. Dobivanje čistih kultura gljiva.....	45
2.2.2. Identifikacija <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> i ostalih izoliranih gljiva .....	46
2.2.3. Morfološka tipizacija izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (fenotipizacija izolata).....	46

2.2.4. Molekularne analize izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	48
2.2.4.1. DNA ekstrakcija izolata <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	50
2.2.4.2. Real Time qPCR za detekciju <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	51
2.2.4.3. Mating types – određivanje idiomorfa seksualnih tipova odabranih izolata....	51
2.2.4.4. Genetska analiza <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> izolata s RAMS bazama početnicama.....	52
2.2.4.5. Testiranje prisutnosti mitovirusa HfMV1 u izolatima <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	53
2.2.4.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu u nativnim uvjetima.....	55
2.2.4.7. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu u denaturirajućim uvjetima .....	59
2.2.5. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća <i>Fraxinus</i> spp.....	60
2.2.6. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	62
2.2.7. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	67
2.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	69
2.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena .....	69
2.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza .....	71
2.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza .....	72
2.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena .....	73
2.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena .....	75
2.3.2.1. Određivanje koncentracije elemenata tehnikom ICP-AES .....	75
2.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena .....	77
2.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	79
2.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva.....	81
2.4. Statistička obrada podataka .....	81
3. REZULTATI.....	83
3.1. <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske.....	83
3.1.1. Rasprostranjenost i širenje patogene gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske .....	83
3.1.2. Osutost stabala .....	85
3.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena .....	87
3.2. Istraživanja izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	91
3.2.1. Identifikacija <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> i ostalih izoliranih gljiva .....	91
3.2.2. Morfološka tipizacija izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (fenotipizacija izolata).....	103

3.2.3. Molekularne analize izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	114
3.2.4. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća <i>Fraxinus</i> spp.....	119
3.2.5. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	124
3.2.6. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	142
3.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	148
3.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena .....	148
3.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza .....	148
3.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza .....	150
3.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena .....	152
3.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena .....	160
3.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena .....	164
3.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	170
3.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva...	178
4. RASPRAVA .....	179
4.1. <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske.....	179
4.1.1. Rasprostranjenost i širenje patogene gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> u šumskim ekosustavima Hrvatske .....	179
4.1.2. Osutost stabala .....	182
4.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena .....	183
4.2. Istraživanja izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	184
4.2.1. Identifikacija <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> i ostalih izoliranih gljiva .....	184
4.2.2. Morfološka tipizacija izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (fenotipizacija izolata).....	185
4.2.3. Molekularne analize izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	188
4.2.4. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća <i>Fraxinus</i> spp.....	194
4.2.5. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	195
4.2.6. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	198
4.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	200
4.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena .....	200
4.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza .....	200
4.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza .....	201



4.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena .....	202
4.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena .....	205
4.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena .....	208
4.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	212
4.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva...	213
5. ZAKLJUČCI .....	214
6. PRILOZI SLIKE .....	217
7. PRILOZI TABLICE .....	233
9. SUMMARY .....	247
10. LITERATURA.....	252
11. ŽIVOTOPIS .....	283
12. CURRICULUM VITAE .....	285
13. ZNANSTVENE AKTIVNOSTI I ZNANSTVENE POBLIKACIJE AUTORA .....	287

## KAZALO SLIKA

Slika 1. Rasprostranjenost poljskog jasena ( <i>Fraxinus angustifolia</i> ) u Europi (Fraxigen 2005)	1
Slika 2. Rasprostranjenost običnog jasena ( <i>Fraxinus excelsior</i> ) u Europi i godine pronalaska prvih simptoma sušenja jasena u pojedinim državama (Bengtsson 2013; Fraxigen 2005)	..... 2
Slika 3. Rasprostranjenost crnog jasena ( <i>Fraxinus ornus</i> ) u Europi (Fraxigen 2005)	..... 3
Slika 4. a) kultura gljive <i>C. fraxinea</i> ; b) micelij gljive <i>C. fraxinea</i> ; c) fijalide gljive <i>C. fraxinea</i> ; d) konidije gljive <i>C. fraxinea</i>	..... 12
Slika 5. a) rahis otpalog lista običnog jasena ( <i>F. excelsior</i> ) s apotecijem gljive <i>H. fraxineus</i> ; b) uvećanje apotecija gljive <i>H. fraxineus</i>	..... 13
Slika 6. a) askus s askosporama gljive <i>H. fraxineus</i> ; b) askospore gljive <i>H. fraxineus</i>	..... 14
Slika 7. Taksonomski položaj gljive <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (Izvor: www.mycobank.org)	..... 15
Slika 8. a) početak nekroze lista običnog jasena koju je prouzročila gljiva <i>H. fraxineus</i> ; b) progresija bolesti iz lista u izbojke običnog jasena, potpuno sušenje lista	..... 17
Slika 9. Gljiva <i>H. fraxineus</i> uzrokuje nekrozu kore	..... 18
Slika 10. Diskoloracija drva, uzročnik <i>H. fraxineus</i>	..... 18
Slika 11. Odumiranje krošnje običnog jasena zbog djelovanja gljive <i>H. fraxineus</i>	..... 20
Slika 12. Ukupne lokacije pozitivnih uzorkovanja poljskog i običnog jasena, do 2016. godine u Republici Hrvatskoj i negativne lokacije uzorkovanja crnog jasena	..... 31
Slika 13. Ukupne lokacije pozitivnih uzorkovanja običnog jasena za dobivanje izolata <i>H. fraxineus</i> u Kraljevini Belgiji 2015. godine	..... 32
Slika 14. Pedološka karta tipova tla na lokacijama uzorkovanja jasena <i>Fraxinus</i> spp. u Hrvatskoj	..... 33
Slika 15. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Pazin, Cres i Senj za razdoblje 1985. – 2015. godine	..... 36
Slika 16. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Delnice, Brinje i Bosiljevo za razdoblje: Delnice (2007. – 2015. godine), Brinje (1997. – 2015. godine) i Bosiljevo (1985. – 2015. godine)	..... 36
Slika 17. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Čazma, Nova Gradiška – Cernik i Gradište za razdoblje: Čazma i Gradište (1985. – 2015. godine), Nova Gradiška – Cernik (1997. – 2015. godine)	..... 37
Slika 18. Shema uzorkovanja drvnog tkiva stabala u tri glavne sekcije	..... 40
Slika 19. Primjeri četiri različita tipa osutosti krošanja jasena (Waser et al. 2014)	..... 43
Slika 20. Shema metode sakupljanja lisnih rahisa s apotecijima gljiva <i>H. fraxineus</i>	..... 45
Slika 21. Sekvence baza početnica i Taqman sonde upotrijebljene u istraživanju (White et al. 1990)	..... 51
Slika 22. a) stanična otopina ili otopina spora; b) Hemocitometar, Neubauer komorica; c) svjetlosni mikroskop; d) pokrovna stakalca; e) pipeta i mikropipeta s jednokratnim vrhovima; f) pufer za razrijeđivanje (PBS)	..... 64
Slika 23. Mreža za brojanje spora u Neubauer komorici	..... 65
Slika 24. Protokoli postavljanja uzorka u Neubauer komoricu, te mikroskopiranja i brojanja	66
Slika 25. Fenološke faze listanja u proljeće (modificirano prema Bogdan 2006, Andrić et al. 2016)	..... 78
Slika 26. Fenološke faze odbacivanja lista u jesen	..... 79

Slika 27. Projekcija vremenskog širenja bolesti uzrokovane gljivom <i>H. fraxineus</i> u Hrvatskoj u periodu od 2009. – 2014. godine.....	84
Slika 28. Prikaz zahvaćenih područja bolesti uzrokovane gljivom <i>H. fraxineus</i> u Hrvatskoj u 2015. godini, te negativni nalazi bez prisutnosti bolesti u mediteranskom području (narančaste točke uzorkovanja).....	85
Slika 29. Prosječna osutost stabala u sastojini prema lokacijama uzorkovanja.....	86
Slika 30. Oštećenost sastojina zaraženih gljivom <i>H. fraxineus</i> u Hrvatskoj.....	87
Slika 31. Prosječan broj apotecija na praćenim lokacijama po mjesecima sakupljanja.....	88
Slika 32. Dendrogram različitih morfotipova izolata.....	104
Slika 33. Prosječan rast izolata pri različitim temperaturama u periodu od 14 dana.....	106
Slika 34. Prosječan rast izolata na 30/20 °C u usporedbi s rastom izolata na 20 °C.....	106
Slika 35. Graf usporedbe frekvencije rasta izolata na 10 °C između Hrvatske i Belgije.....	108
Slika 36. Graf usporedbe frekvencije rasta izolata na 20 °C između Hrvatske i Belgije.....	109
Slika 37. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> na temperaturi od 10 °C grupiranih prema lokaciji.....	111
Slika 38. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> na temperaturi od 10 °C.....	112
Slika 39. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pri temperaturi od 20 °C grupiranih prema lokaciji.....	113
Slika 40. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pri temperaturi od 20 °C.....	114
Slika 41. Tipovi idiomorfa gljive <i>H. fraxineus</i> (MAT1; MAT2) kod izabranih izolata za molekularne analize.....	115
Slika 42. Unrooted filogenetsko stablo izrađeno prema Neighbor-joining metodi (Bootstrapping 1000x).....	117
Slika 43. Filogram stablo izrađeno prema Neighbor-joining metodi (Bootstrapping 1000x).....	118
Slika 44. Prisutnost mitovirusa HfMV1 u izabranim izolatima gljive <i>H. fraxineus</i> za molekularne analize.....	119
Slika 45. Rast izolata gljive <i>H. fraxineus</i> na različitim hranidbenim medijima s dodatkom ekstrakta lišća autohtonih vrsta jasena ( <i>F. excelsior</i> , <i>F. angustifoli</i> i <i>F. ornus</i> ), te kontrolna skupina bez dodatka ekstrakta lišća jasena u vremenskom periodu od 14 dana.....	120
Slika 46. Distribucija rasta izolata na različitim tipovima agar mediuma s dodatkom ekstrakta lišća jasena (FE, FA, F0 i kontrola).....	122
Slika 47. Utjecaj različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast kultura gljive <i>H. fraxineus</i> pri optimalnim uvjetima temperature od 20 °C u vremenskom periodu od 21 dan.....	124
Slika 48. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem ultravioletnog UVB svjetla.....	125
Slika 49. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> u mraku bez utjecaja ultravioletnog svjetla.....	126
Slika 50. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem ultravioletnog UVA svjetla.....	128
Slika 51. Distribucija rasta izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem vidljivog djela spektra VS svjetla.....	131
Slika 52. Utjecaj različitih valnih duljina UV svjetlosti na fruktifikaciju (sporulaciju) kultura gljive <i>H. fraxinus</i> pri optimalnim uvjetima temperature od 20 °C u vremenskom periodu od 21 dan.....	133
Slika 53. Distribucija fruktifikacije izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem ultravioletne UVB svjetlosti.....	134

Slika 54. Distribucija fruktifikacije izolata gljive <i>H. fraxineus</i> u mraku bez utjecaja ultravioletnog svjetla .....	135
Slika 55. Distribucija fruktifikacije izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem ultravioletne UVA svjetlosti.....	137
Slika 56. Distribucija fruktifikacije izolata gljive <i>H. fraxineus</i> pod djelovanjem vidljivog djela spektra VS svjetla.....	140
Slika 57. Utjecaj Allicina na rast izolata <i>H. fraxineus</i> kurativnim metodama suzbijanja patogena <i>in vitro</i> nakon 14 dana .....	142
Slika 58. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na rast izolata <i>H. fraxineus</i> protektivnim metodama suzbijanja patogena <i>in vitro</i> nakon 14 dana.....	144
Slika 59. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na fruktifikaciju izolata <i>H. fraxineus</i> kurativnim metodama suzbijanja patogena <i>in vitro</i> .....	145
Slika 60. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na fruktifikaciju izolata <i>H. fraxineus</i> protektivnim metodama suzbijanja patogena <i>in vitro</i> .....	146
Slika 61. Duljina nekroza na umjetno inficiranim sadnicama <i>F. excelsior</i> gljivom <i>H. fraxineus</i> u optimalnim laboratorijskim i prirodnim uvjetima ljetnih mjesečnih razdoblja (04.7.2014. – 05.9.2014.).....	148
Slika 62. Srednje dnevne temperature zraka u laboratorijskim uvjetima (23 °C) i u prirodnim uvjetima (promijenljive temperature mjerne postaje Zagreb – Maksimir za razdoblje 04.7.2014 – 05.9.2014. godine).....	149
Slika 63. Distribucija duljine nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama <i>F. excelsior</i> u uvjetima konstantne temperature (23 °C), te promijenljive temperature prirodnih uvjeta ljetnog perioda.....	150
Slika 64. Duljina nekroza na sadnicama <i>F. angustifolia</i> i <i>F. excelsior</i> umjetno zaraženim istim izolatom gljive <i>H. fraxineus</i> u laboratorijskim uvjetima pri temperaturi od 23 °C.....	151
Slika 65. Distribucija duljine nekroza s obzirom na vrstu biljke domaćina inokuliranim patogenom <i>H. fraxineus</i> .....	151
Slika 66. Duljina nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama klonova poljskog jasena ( <i>F. angustifolia</i> ) s dva izolata patogene gljive <i>H. fraxineus</i> , u vremenskom periodu od 140 dana .....	153
Slika 67. Rast promjera na umjetno inokuliranim sadnicama klonova poljskog jasena ( <i>F. angustifolia</i> ) s dva izolata patogene gljive <i>H. fraxineus</i> , te kontrolne sadnice inokulirane sterilnim mediumom .....	154
Slika 68. Prosječna duljina nekroza na inokuliranim sadnicama <i>F. angustifolia</i> neovisno o upotrebljenom izolatu patogena <i>H. fraxineus</i> .....	154
Slika 69. Stopa mortaliteta inficiranih sadnica odnosno udio inficiranih sadnica prema stupnju oštećenosti .....	155
Slika 70. Koeficijent varijacije (CV) duljine nekroza unutar klona (%).....	156
Slika 71. Distribucija duljine nekroza na klonovima poljskog jasena s dva različita izolata gljivičnog patogena <i>H. fraxineus</i> .....	158
Slika 72. Distribucija duljine nekroza na klonovima poljskog jasena neovisno o gljivičnim izolatima.....	160
Slika 73. Distribucija dana do prolistavanja za svaki klon u testiranju.....	166
Slika 74. Distribucija fenofaza odbacivanja lista u jednom mjerenju za svaki klon u testiranju .....	168

Slika 75. Duljina nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama običnog i poljskog jasena s izolatima patogene gljive <i>H. fraxineus</i> sa i bez prisutnosti mitovirusa HfMV1 .....	171
Slika 76. Distribucija duljine nekroza na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogene <i>H. fraxineus</i> sa i bez mitovirusa HfMV1 .....	172
Slika 77. Rast promjera umjetno inokuliranih sadnica običnog i poljskog jasena s izolatima gljive <i>H. fraxineus</i> sa i bez mitovirusa HfMV1 .....	174
Slika 78. Distribucija rasta promjera na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogene <i>H. fraxineus</i> sa i bez mitovirusa HfMV1 .....	175
Slika 79. Duljina nekroza 30 dana nakon injektiranja Allicin sredstva zaštite bilja u sadnice <i>F. angustifolia</i> prethodno umjetno inokulirane patogenom <i>H. fraxineus</i> (testiranje <i>in vivo</i> ).....	178
Slika 80. Protokol za DNA ekstrakciju s NucleoSpin Plant II kit.....	217
Slika 81. Real Time qPCR protokolni obrazac .....	218
Slika 82. Protokol određivanja idiomorfa izolata gljive <i>H. fraxineus</i> .....	219
Slika 83. Protokol genetičke analize s RAMS bazama početnicama .....	220
Slika 84. Protokol RNA ekstrakcije za detekciju HfMV1 .....	221
Slika 85. Protokol sinteze cDNA za detekciju HfMV1 .....	222
Slika 86. Protokol PCR amplifikacije za detekciju HfMV1 .....	223
Slika 87. Procjena osutosti krošnje stabala <i>Fraxinus</i> spp. u razdoblju od 2009. – 2012. godine (www.icp.sumins.hr) .....	224
Slika 88. Procjena osutosti krošnje stabala <i>Fraxinus</i> spp. u razdoblju od 2013. – 2016. godine (www.icp.sumins.hr) .....	225
Slika 89. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (1/3) .....	226
Slika 90. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (2/3) .....	227
Slika 91. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (3/3) .....	228
Slika 92. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom <i>H. fraxineus</i> s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (1/4).....	229
Slika 93. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom <i>H. fraxineus</i> s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (2/4).....	230
Slika 94. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom <i>H. fraxineus</i> s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (3/4).....	231
Slika 95. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom <i>H. fraxineus</i> s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (4/4).....	232

## KAZALO TABLICA

Tablica 1. Osutost poljskog jasena po klasama osutosti u razdoblju od 2006. do 2016. godine (Potočić et al. 2017) .....	4
Tablica 2. Stupnjevi osutosti krošanja prema ICP Forests metodi (Potočić et al. 2016) .....	42
Tablica 3. Popis odabranih izolata za morfološku i molekularnu tipizaciju .....	48
Tablica 4. Lista parova baza početnica za amplifikaciju i resekvencioniranje HfMV1, te nove baze početnice za specifičnu amplifikaciju actin gena <i>H. fraxineus</i> (Schoebel et al. 2014)....	54
Tablica 5. Odabrani izolati patogena <i>H. fraxineus</i> za testiranje utjecaja UV svjetlosti na rast patogena .....	62
Tablica 6. Odabrani izolati patogena <i>H. fraxineus</i> za testiranje djelotvornosti Allicin sredstva zaštite.....	68
Tablica 7. Odabrani izolati patogena <i>H. fraxineus</i> za testiranje hipovirulentnosti .....	80
Tablica 8. Korelacija prosječne osutosti stabala i broja apotecija za obični jasen.....	89
Tablica 9. Korelacija osutosti stabala i broja apotecija za poljski jasen .....	90
Tablica 10. Test normalnosti distribucije broja apotecija za lokacije .....	90
Tablica 11. Levenov test i ANOVA.....	91
Tablica 12. Najčešće izolirane vrste gljiva uz <i>H. fraxineus</i> iz tkiva jasena .....	92
Tablica 13. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (1/9)	94
Tablica 14. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (2/9)	95
Tablica 15. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (3/9)	96
Tablica 16. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (4/9)	97
Tablica 17. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (5/9)	98
Tablica 18. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (6/9)	99
Tablica 19. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (7/9) .....	100
Tablica 20. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (8/9) .....	101
Tablica 21. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (9/9) .....	102
Tablica 22. Test normalnosti i Mann Whitney U test za temperature od 10 °C .....	107
Tablica 23. Test normalnosti i Mann Whitney U test za temperature od 20 °C .....	109
Tablica 24. Rezultati statističke analize za rast izolata na različitim hranidbenim podlogama s ekstraktima lišća autohtonih vrsta jasena .....	123
Tablica 25. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem UVB svjetla .....	127
Tablica 26. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem UVA svjetla .....	130
Tablica 27. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem VS svjetla.....	132
Tablica 28. Rezultati statističke analize za fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVB svjetla .....	136
Tablica 29.:Rezultati statističke analize za fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVA svjetla .....	139
Tablica 30. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem VS svjetla.....	141
Tablica 31. Rezultati statističke analize za duljinu nekroza s obzirom na vrstu domaćina inficiranog patogenom <i>H. fraxineus</i> .....	152

Tablica 32. Korelacija vrijednosti rasta duljine nekroza po razdobljima mjerenja na svakom klonu.....	159
Tablica 33. Rezultati klaster analize za proljetnu fenologiju (K-means).....	165
Tablica 34. Rezultati klaster analize za jesensku fenologiju (K-means).....	167
Tablica 35. Rezultati usporedbe fenoloških istraživanja s testovima osjetljivosti klonova ...	169
Tablica 36. Grupe različitih duljina vegetacijskog perioda s pripadnošću klonova.....	169
Tablica 37. Rezultati statističke analize za duljinu nekroza na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena <i>H. fraxineus</i> sa i bez mitovirusa HfMV1 .....	173
Tablica 38. Rezultati statističke analize za rast promjera na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena <i>H. fraxineus</i> sa i bez mitovirusa HfMV1 .....	177
Tablica 39. Parametri instrumentalne analize .....	233
Tablica 40. Pozitivne lokacije prisutnosti gljive <i>H. fraxineus</i> u razdoblju 2013. – 2016. godine 1/2.....	234
Tablica 41. Pozitivne lokacije prisutnosti gljive <i>H. fraxineus</i> u razdoblju 2013. – 2016. godine 2/2.....	235
Tablica 42. Odabrane pozitivne lokacije gljive <i>H. fraxineus</i> za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (1/5).....	236
Tablica 43. Odabrane pozitivne lokacije gljive <i>H. fraxineus</i> za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (2/5).....	237
Tablica 44. Odabrane pozitivne lokacije gljive <i>H. fraxineus</i> za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (3/5).....	238
Tablica 45. Odabrane pozitivne lokacije gljive <i>H. fraxineus</i> za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (4/5).....	239
Tablica 46. Odabrane pozitivne lokacije gljive <i>H. fraxineus</i> za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (5/5).....	240
Tablica 47. Odabrani uzorci <i>H. fraxineus</i> za morfološku tipizaciju rasta pri različitim temperaturama.....	241
Tablica 48. Popis izolata za molekularne analize s rezultatima prisutnosti mitovirusa i tipom idiomorfa .....	242
Tablica 49. Tablica kvantifikacije ekstrahirane DNA i qPCR (Ct) vrijednosti praga.....	243
Tablica 50. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (1/3) .....	244
Tablica 51. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (2/3) .....	245
Tablica 52. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (3/3) .....	246

## PREDGOVOR I ZAHVALE

Ova disertacija je rezultat provedenih istraživanja u sklopu projekta „Ekologija i obnova poplavnih šuma posavine“, financiranog od strane tvrtke Hrvatske šume d.o.o., a kasnije i Ministarstva poljoprivrede, a voditelj projekta je prof. dr. sc. Boris Hrašovec, te projekta FRAXINPRO “Uloga biotičkih čimbenika na vitalitet poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u poplavnim šumama Hrvatske” (HRZZ-4250) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, a voditelj projekta je prof. dr. sc. Josip Margaletić. Izrađena je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje, a dio istraživanja financiran je i sredstvima COST (European Cooperation in Science and Technology) projekta FRAXBACK FP1103 (*Fraxinus* dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management), voditelj projekta je Dr. Rimvydas Vasaitis, Swedish University of Agricultural Sciences Department of Animal Breeding and Genetics, Uppsala.

Doktorski rad temom obuhvaća područje šumarske fitopatologije i integrirane zaštite šuma, no ulazi i u mnogo širu problematiku. Principi djelovanja specifičnog patogena poput *Hymenoscyphus fraxineus* iziskuju dublje zadiranje u ekološke odnose koji čine pojedino stanište. Posebna ravnoteža abiotičkih i biotičkih odnosa u staništu o kojoj se zna vrlo malo ekstremno je krhke naravi, te promjena odnosa u takvom sustavu može izazvati lančanu reakciju negativnih elemenata s katastrofičnim posljedicama na ekosustav koji danas poznajemo. Jedan od takvih negativnih elemenata je i gljivični patogen *Hymenoscyphus fraxineus* koji je u samo jedno desetljeće u Hrvatskoj uspio dovesti u pitanje 250 godina tradicijskog gospodarenja jasenovim sastojinama. S obzirom na to, u istraživanje je bilo potrebno detaljnije uključiti rezultate mikrostanišnih prilika, ali i proširiti, promijeniti i poboljšati klasične fitopatološke metode istraživanja.

Postoji neslaganje između onog što znanost spoznaje i što praksa odnosno ekonomski profitabilno orijentirane korporacije čine na terenu. Zabrinjavajuća je činjenica da dok stojimo ovdje na rubu kolapsa ekosustava kakvog stoljećima poznajemo, organizacije, tvrtke pa i zakonodavna tijela donose odluke i pravilnike na temelju pokazatelja koji su zastarijeli, neistraženi i imaju temelje više u tradicijskim smjernicama nego u znanosti. Pojava dosad nezabilježenog broja novih gljivičnih bolesti dovela je do uzrokovanja jednog od najvećih odumiranja vrsta u povijesti, sve zahvaljujući intenziviranju disperzije gljivičnih bolesti. Ta disperzija uzrokovana je nezaustavljivim širenjem i transportom robne razmjene, te je stoga jasno da je vrijeme za dogovore i pregovore i nevoljkost financiranja znanstvenih istraživanja stvar prošlosti jer patogena ne zanimaju izvori financiranja, problemi na tržištu niti traži dozvolu ulaska u zemlju već traži odgovor na samo jedno pitanje koje glasi: jesi li ti moj domaćin? Bez adekvatnih znanstvenih istraživanja i smjernica budućeg gospodarenja usklađenih s tim istraživanjima, te povezivanja i usklađivanja znanosti i struke da mogu efektivno i brzo reagirati prilikom detekcije novih nepredvidivih napada, šumske sastojine mogle bi zahvatiti devastirajuće promjene. Uz ovakvu visoku stopu novih invazivnih vrsta i sve češćih klimatoloških i drugih abiotskih ekstrema, sastojine Republike Hrvatske kroz nekoliko desetljeća mogle bi ostati bez svih glavnih gospodarskih vrsta drveća na kojima danas počiva tradicionalno hrvatsko šumarstvo.



Posebno se želim zahvaliti mojoj matičnoj instituciji, Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, čije sam iznimno povjerenje i potporu uživao tijekom svih proteklih godina. Veliko hvala prošlom dekanu prof. dr. sc. Milanu Oršaniću, kao i aktualnom dekanu prof. dr. sc. Vladimiru Jambrekoviću koji su bili i jesu potpora nama mladim asistentima, koji shvaćaju važnost edukacije i znanstvenog usavršavanja mlađih generacija, te koji su na prvoj liniji obrane naših radnih mjesta, naših sudjelovanja u projektima, našeg statusa u znanstvenoj zajednici i društvu, ali i mnogo više od toga. Hvala i mom trenutnom predstojniku zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje prof. dr. sc. Marijanu Grubešiću, kao i prošlom predstojniku prof. dr. sc. Borisu Hrašovcu koji je tijekom mog doktorskog studija obnašao dužnost mog studijskog voditelja. Hvala mu na njegovoj bezrezervnoj potpori i uvijek otvorenim vratima za pitanja i razgovor. Cijelo se vrijeme brinuo o mom napretku, datumima, rokovima, pravilima i slično. Bez njegovih informacija, uputstava, entuzijazma, inkvizitorskih pitanja i rasprava na hodnicima zavoda vjerujte štošta u ovoj disertaciji nebi bilo moguće. Začetnik je mnogih promišljanja i ideja koje su se razvile u svakojake pokuse i utabale put ovim rezultatima.

Iznimno sam zahvalan svim mojim kolegama sa zavoda, doc. dr. sc. Milivoju Franjeviću, dr. sc. Kristijanu Tomljanoviću, dr. sc. Marku Vucelji, dr. sc. Lindi Bjedov i Jeleni Kranjec, mag. ing. silv. na pomoći na mnogobrojnim savjetima oko metodologije, prikupljanja i obrade podataka bez kojih bi sve puno duže trajalo. Zahvalan sam svim svojim starijim kolegama sa zavoda što su u svakom trenutku bili tu za mene i pomogli kada mi je to bilo potrebno, te što su me bez zadržke od samog početka prihvatili kao člana zavodskog tima. Posebna zahvala Leopoldu Cvetanu na teorijskoj i praktičnoj pomoći postavljanja istraživačkih ploha, sakupljanja uzoraka na terenu, njihovoj kasnijoj obradi i životnim lekcijama, te mogu slobodno reći da je bio u mnogočemu nama mlađima drugi otac i svojevrstan neslužbeno dodijeljeni zavodski mentor.

Hvala također i Nevenki Magovac što je marljivo vodila brigu o hrpi papirologije u pozadini svih projekata, terenskih istraživanja, laboratorijske opreme i drugo koja je pratila ovo istraživanje. Hvala i našoj Marijani Mrvelj koja je napravila uvijek reda u našem neredu i kojoj smo bezbroj puta ostavili iza napornog dana ili terena kaos u laboratoriju, uredu ili nekim drugim prostorijama.

Posebna hvala i prof. dr. sc. Josipu Margaletiću na njegovoj ljubaznosti, svesrdnoj pomoći za svaki iskršli problem, kao i za njegovu bezrezervnu podršku u istraživanju kroz projekt hrvatske zaklade za znanost.

Hvala voditeljima UŠP Nova Gradiška, Bjelovar, Zagreb, Vinkovci, Sisak, Karlovac, Delnice, Ogulin, Gospić, Senj i Buzet što su mi omogućili istraživanje na njihovom području pruživši mi svu tehničku i logističku pomoć. Također se želim zahvaliti svim ostalim djelatnicima Hrvatskih šuma d.o.o. na njihovoj nesebičnoj pomoći, posebno djelatnicima Ivani Ribarić mag. ing. silv., Suzani Penić dipl. ing. šum. i Bernardi Bukovac dipl. ing. šum.

Hvala Doc. dr. sc. Viboru Roji i dr. sc. Ivanu Perkoviću na laboratorijskim analizama uzoraka lišća, prof. dr. sc. Anamariji Jazbec na pomoći i savjetima oko statističke obrade podataka.

Hvala kolegi dr.sc. Željku Zgrabliću na prijateljstvu, pomoći i podršci tijekom izrade ove disertacije. Također hvala kolegama Ivanu Limiću mag. ing. silv. i Mauru Damiću mag. ing. silv. na ispomoći kod terenskih i laboratorijskih istraživanja i obrade uzoraka.

Hvala mr. sc. Janji Milković i Damiru Mlineku iz Državnog hidrometeorološkog zavoda na ustupljenim meteorološkim podacima.

Velika hvala prof. dr. sc. Davorinu Kajbi na suradnji i na pomoći pri istraživanju genetičkih i fenoloških svojstava poljskog jasena u klonskim sjemenskim plantažama, te na svojoj podršci koju mi je pružao u godinama istraživanja.

Na kraju, ali nikako najmanje važno, želim se zahvaliti svom mentoru. Prof. dr. sc. Danko Diminić ukazao mi je povjerenje da ostvarimo zajednički istraživački cilj. Iznimnim strpljenjem, pedantnošću, predanošću i strašću prema fitopatologiji nesebično mi je darivao znanje koje je i sam mukotrpno stekao, na čemu ću mu uvijek biti zahvalan. Interdisciplinarnost, te često nepredvidivost istraživanja i njegovih rezultata uspješno je usklađivao vodeći me neprestano kroz izradu ove disertacije svojom vizijom kao nepokolebljivi kompas. Bilo je trenutaka kada se početno nisam slagao s načinom izvođenja ili s idejom pojedinih segmenata istraživanja, ali sam vjerovao njegovom iskustvu i instinktu unatoč svojim nedoumicama. Na posljetku nisam nikada ostao razočaran rezultatima već upravo suprotno. Naučio me da neuspjeh može ponekad biti važniji od uspjeha i da nam daje jasnoću gdje dalje fokusirati svoju energiju u napredovanju prema svom cilju. Zatvaranje jednog prolaza ne označava kraj puta, već otvara neizmjerne prostranstva novih mogućnosti. Profesore, na svemu sam Vam neizmjerne zahvalan.

Hvala i svim prijateljima i kolegama koji su u bilo kojem trenutku i na bilo koji način doprinijeli izradi ove disertacije.

Marno Milotić

## PODACI O MENTORU

**Prof. dr. sc. Danko Diminić** rođen je 1961. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađa u Labinu, gdje 1980. godine završava i srednju školu stekavši zvanje suradnika u nastavi. Studij šumarstva na Šumarskom odjelu Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu završava 1989. godine diplomskim radom "Životni ciklus nekih gljiva uzročnika osipanja iglica četinjača u nas". Poslijediplomski studij iz područja zaštita šuma završava 1993. godine na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, znanstvenim magistarskim radom "Prilog poznavanju mikoza borovih kultura u Istri" pod vodstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša. Godine 1997. doktorirao je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, iz područja biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma, obranivši doktorski rad "Istraživanje gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton na borovima u Hrvatskoj" pod vodstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša.

Od ožujka do prosinca 1989. godine zaposlen je u Šumarskom institutu u Jastrebarskom gdje radi na poslovima zaštite šuma. Od 1990.-1993. godine zaposlen je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u Katedri za zaštitu šuma kao mlađi istraživač. Od 1993.-1997. radi kao asistent na predmetu Šumarska fitopatologija, a od 1997.-1998. kao viši asistent. U znanstveno-nastavno zvanje docent na predmetu Šumarska fitopatologija izabran je 1998., a 2003. ponovno je izabran u isto zvanje na predmetima Šumarska fitopatologija i Zaštita šuma na Šumarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno zvanje viši znanstveni suradnik izabran je 2005., a u znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor 2007. godine. U znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u znanstvenom području biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma izabran je 2009., a u znanstveno-nastavno zvanje redoviti profesor 2011. godine, te 2016. godine izabran je u trajno zvanje redovitog profesora

Nastavnik je na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, od 1999-2005. na 9 kolegija i od 2005. na 8 kolegija. Na poslijediplomskom studiju Gozdarstvo in obnovljivi gozdni viri, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, bio je sunositelj predmeta „Gozdna fitopatologija“ u razdoblju akad. god. 2001/2002. do 2009/2010.

U razdoblju od 01. listopada do 25. prosinca 1995. boravi u Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN-DLO) Wageningen, Nizozemska (današnja Alterra). Tijekom znanstvenog i stručnog boravka savladava moderne laboratorijske metode u fitopatologiji i

mikologiji, te radi na istraživanju gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton u okviru teme svoje doktorske disertacije. Bio je gost krajobraznog projektnog biroa Nieuwland Advies iz Wageningena. U razdoblju od 23. rujna do 08. listopada 2001. boravio u sklopu Short-Term Scientific Missions pri COST-u Action E12, Urban Forests and Trees, u Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA), Madrid, Španjolska.

Bio je voditelj 7 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekta i suradnik na 10 projekata. Trenutno je voditelj 1 nacionalnog znanstveno-istraživačkog projekta te suradnik na 2 projekta. Sudjelovao je u radu više međunarodnih i nacionalnih skupova u Europi i Hrvatskoj, od toga aktivno prezentiravši rezultate vlastitih ili timskih istraživanja na 13 međunarodnih znanstvenih skupova (14 priopćenja) i 22 nacionalna znanstvena skupa (29 priopćenja).

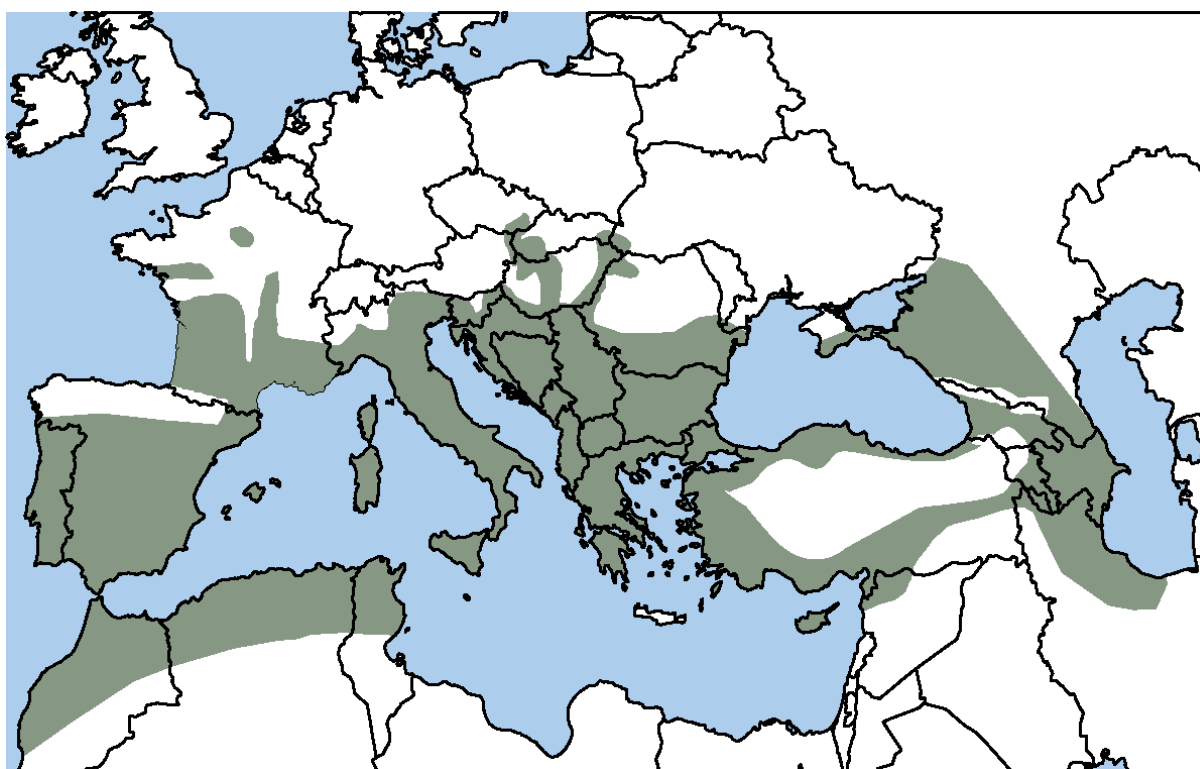
Od akademske godine 2005./2006. voditelj je diplomskog studija Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša na Sveučilištu u Zagrebu Šumarskom fakultetu. Od 2009. godine predstavnik je Republike Hrvatske u European Mycological Network (EMN). Član je Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja Vijeća biotehničkog područja od 2013., te član Povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu za akademsko priznavanje inozemnih visokoškolskih kvalifikacija (IVK) od prosinca 2014. U akad. god. 2014./2015. i 2015./2016. obnaša dužnost Prodekana za međunarodnu suradnju Šumarskog fakulteta.

Član je Akademije šumarskih znanosti (izvanredni član), Hrvatskog šumarskog društva, Hrvatskog društva biljne zaštite, British Mycological Society i European Mycological Network. Član je Management Committee u sklopu dviju COST Akcija FP1102 DIAROD i FP1103 FRAXBACK. Kao član European Mycological Network (EMN) sudjelovao je 2009., 2011. i 2013. u izradi 18 protokola za dijagnosticiranje fitopatogenih gljiva u okviru European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) - Diagnostic Protocols for Fungi.

Objavio je 48 znanstvenih radova i to: 17 radova iz skupine a1; 16 iz skupine a2; 1 rad iz skupine a3; te 14 radova koji nisu indeksirani u navedenim skupinama. Koautor je jednog sveučilišnog priručnika i četiri znanstvene knjige. Aktivno se služi engleskim jezikom.

## 1. UVOD

U Hrvatskoj pridolaze, kao i u Europi, tri autohtone vrste unutar roda *Fraxinus* od ukupno 43 vrste koje se nalaze unutar toga roda (Wallander et al. 2008): obični jasen (*Fraxinus excelsior* L.), poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) i crni jasen (*Fraxinus ornus* L.). O njima postoji prilično opsežna literatura, posebno u radovima koji se bave vegetacijom nekog područja. Poljski jasen kao zasebna vrsta jasena u Europi opisan je posljednji, 1804. godine od strane švedskog botaničara Vahl-a na primjercima iz Španjolske. U Hrvatskoj ga prvi navodi i istražuje (Fukarek 1954). Sve tri vrste u svojoj ekološkoj niši imaju izuzetno važnu i nezamjenjivu gospodarsku, ekološku i socijalnu ulogu.



Slika 1. Rasprostranjenost poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia*) u Europi (Fraxigen 2005)

Figure 1. Distribution map of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*) in Europe (Fraxigen 2005)

Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) ima nezamjenjivi ekonomski značaj jer je nakon hrasta lužnjaka najzastupljenija vrsta nizinskih šuma Hrvatske (Slika 1). Najveće šumske komplekse nalazimo u Posavini (oko 80%), te manje u Pokuplju, Podravini i Podunavlju. Zbog svojih ekoloških obilježja često dolazi u čistim sastojinama, a rjeđe u mješovitim s hrastom lužnjakom i crnom johom (Anić 2004). Nezaobilazna je pionirska vrsta drveća koja uspijeva u nepovoljnim barskim uvjetima gdje stvara povoljne uvjete za pridolazak klimatogene vrste. Nizinske poplavne šume poljskog jasena i hrasta lužnjaka u Hrvatskoj

jedni su od najbolje očuvanih kompleksa nizinskih poplavnih šuma u Europi (Temunović 2013).



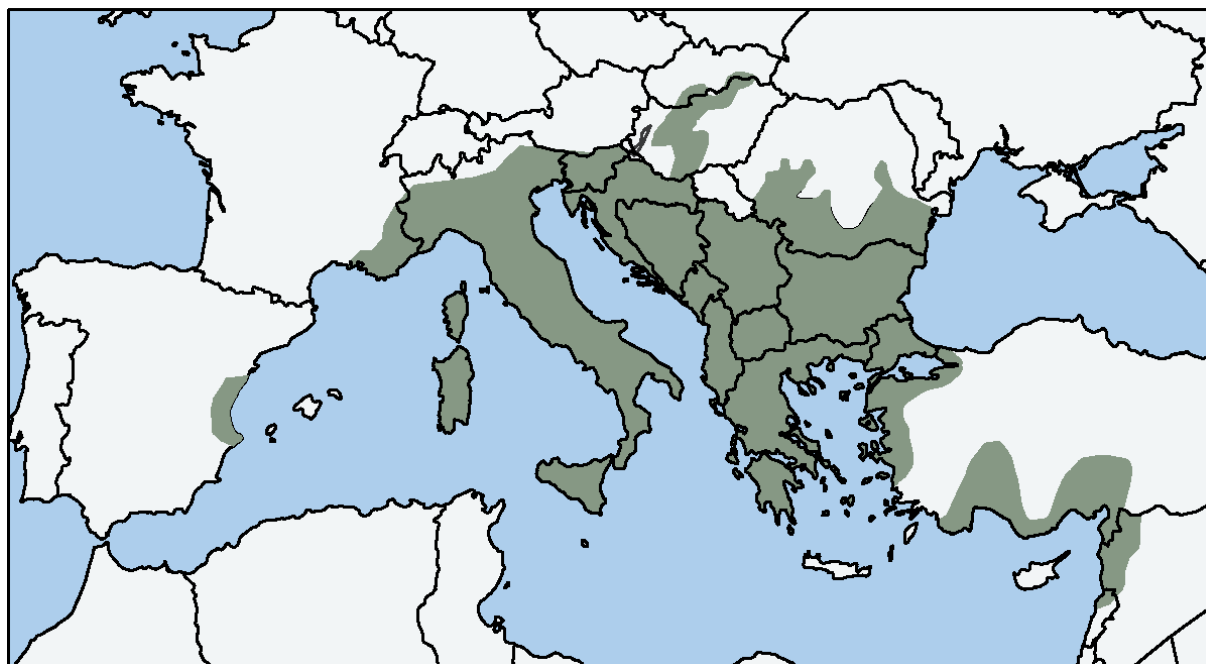
Slika 2. Rasprostranjenost običnog jasena (*Fraxinus excelsior*) u Europi i godine pronalaska prvih simptoma sušenja jasena u pojedinim državama (Bengtsson 2013; Fraxigen 2005)

Figure 2. Distribution map of common ash in Europe and years of first ash dieback symptoms observations in particular country (Bengtsson 2013; Fraxigen 2005)

Obični jasen (*Fraxinus excelsior*) je najrasprostranjenija i najveća vrsta roda *Fraxinus* u Europi (Slika 2). U brdovitim i planinskim područjima Hrvatske gospodarski je i ekološki nezamjenjiva u mješovitim sastojinama s jelom, smrekom, bukvom, javorom, lipom i brijestom (Topić & Vukelić, 2009). Ispoljava intermedijarna svojstva između pionirske i trajne vrste, međutim kompetitivna sposobnost vrste je jaka samo ako su zadovoljeni ekološki preduvjeti.

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) od sve tri vrste europskih jasena ima najograničeniju rasprostranjenost (Slika 3). Dolazi u mediteranskoj i submediteranskoj regiji, te u zoni termofilnih šuma kontinentalnih mješovitih sastojina (Topić & Vukelić, 2009). Velika gustoća stabala, velika sjemena klijavost, brza kolonizacija novih staništa, te dobra izbojna moć

omogućava da *F. ornus* bude dominantna vrsta u većini svojih staništa što je čini vrijednom vrstom za ekološku obnovu.



Slika 3. Rasprostranjenost crnog jasena (*Fraxinus ornus*) u Europi (Fraxigen 2005)

Figure 3. Distribution of manna ash (*Fraxinus ornus*) in Europe (Fraxigen 2005)

Do nedavno u Hrvatskoj se pretpostavljalo da ima oko 4 milijuna m<sup>3</sup> drvene zalihe poljskog jasena, dok su ostale vrste jasena u pogledu drvene zalihe bile nepoznanica. Prva nacionalna inventura šuma 2009. godine pokazala je prvo realno stanje drvene zalihe gdje poljski jasen kao što je pretpostavljeno ima najveću drvenu zalihu od čak 17600000 m<sup>3</sup>, slijedi ga crni jasen s drvnom zalihom od 2200000 m<sup>3</sup>, te posljednji od autohtonih vrsta jesena je obični jasen s drvnom zalihom od 1150000 m<sup>3</sup> (Čavlović 2010). Iako crni jasen tvori većinom zaštitne šume mediteranskog pojasa, te u gospodarskom smislu ne predstavlja ekonomski značaj kao druge dvije vrste, svejedno je impozantna vrijednost drvene zalihe sve tri vrste.

U prošlosti nije zabilježena ozbiljnija pojava biljnih bolesti na jasenima već samo sporadične pojave štetnika, te su jaseni smatrani vrstama s dobrim zdravstvenim stanjem (Tikvić & Seletković 2004). Posljednjih tridesetak godina klimatske promjene i negativan antropogeni utjecaj, sve češći i jači napadi pojedinih štetnika izazvali su masovna sušenja i odumiranja jasenovih stabala. Šume poljskog jasena dio su ekosustava poplavnih šuma Hrvatske, a s obzirom na prostornu cjelovitost te strukturnu, funkcionalnu i gospodarsku očuvanost reprezentiraju ponajveći areal poplavnih jasenovih šuma u Europi (Anić, 2001). Prvo masovno sušenje poljskog jasena u Hrvatskoj zabilježeno je od 1943. - 1947. godine (Spaić,

1955). U Hrvatskoj 1991. godine utvrđeno je najintenzivnije sušenje poljskog jasena u Europi (Harapin 1991), što se pripisuje integriranom djelovanju različitih utjecajnih čimbenika. U sklopu programa motrenja oštećenosti šumskih ekosustava Republike Hrvatske koje provodi Nacionalni koordinacijski centar UNECE ICP Forests<sup>1</sup> u Hrvatskoj smješten u Hrvatskom šumarskom institutu, utvrđeno je povećanje osutosti autohtonih vrsta jasena u Hrvatskoj. U razdoblju od 2012. do 2016. godine, postotak značajno osutih stabala (stabla osutosti > 25%) svake se godine dramatično povećava (Potočić et al. 2015; Potočić et al. 2016; Potočić et al. 2017) (Tablica 1, u prilogu Slika 87; Slika 88), a od 2015. godine poljski jasen u Hrvatskoj je najoštećenija vrsta.

Tablica 1. Osutost poljskog jasena po klasama osutosti u razdoblju od 2006. do 2016. godine (Potočić et al. 2017)

Table 1. Defoliation of narrow-leaved ash by class in the period from year 2006 till 2016 (Potočić et al. 2017)

Godina	Kategorije osutosti, %				Značajno osuto
	0	1	2	3 + 4	2 + 3 + 4
<b>2006</b>	65,43	29,63	3,70	1,23	4,94
<b>2007</b>	58,02	33,33	8,64	0,00	8,64
<b>2008</b>	61,25	30,00	8,75	0,00	8,75
<b>2009</b>	44,44	34,72	18,06	2,78	20,83
<b>2010</b>	52,11	32,39	14,08	1,41	15,49
<b>2011</b>	49,30	33,80	15,49	1,41	16,90
<b>2012</b>	33,33	54,17	12,50	0,00	12,50
<b>2013</b>	18,06	58,33	22,22	1,39	23,61
<b>2014</b>	14,55	36,36	45,45	3,64	49,09
<b>2015</b>	15,28	22,22	50,00	12,50	62,50
<b>2016</b>	11,11	16,67	61,11	11,11	72,22

Poljski jasen se uz hrast lužnjak, s obzirom na osutost, smatra najosjetljivijom vrstom nizinskih šuma Hrvatske (Prpić et al. 1991). Domaći autori (Barić et al. 2012) navode prisutnost fitopatogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* na običnom i poljskom jasenu u Hrvatskoj, međutim patogen još uvijek nije potvrđen kao primarni uzročnik odumiranja poljskog jasena u nizinskim šumama Hrvatske. Strani autori ovog patogena smatraju jednim od primarnih uzročnika odumiranja običnog i poljskog jasena u Europi (Bakys et al. 2009; Kräutler & Kirisits 2012; Gross et al. 2014; Kraj et al. 2012). U posljednjih dvadesetak godina

<sup>1</sup> International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests



u sjevernim dijelovima Europe započelo je razdoblje velikog odumiranja jasena, koje se do danas raširilo na veći dio europskog kontinenta. U susjednoj Sloveniji (Jurc & Ogris, 2008) propćuju da je u najpogođenijim sastojinama jasena odumrlo više od 60 % jesnovih stabala. Uzrok tako opsežne epifitocije je anamorf 2006. godine opisane gljive *Chalara fraxinea* T. Kowalski. Prema dosadašnjim spoznajama za širenje bolesti i uzrokovanje novih infekcija je najviše zaslužan njen teleomorfni stadij opisan 2014. godine pod nazivom *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya opisan još 2011. godine pod imenom *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Queloz et al. 2011a). Nakon holandske bolesti brijesta, u Europi kao i u Hrvatskoj, koja je izbrisala trećinu sastojina u kojima je brijest bio prisutan kao autohtona klimatogena vrsta, zatim raka kestenove kore koji je neporavljivo narušio strukturu svih sastojina pitomog kestena, treći veliki udarac je nova bolest jasena. Nova bolest jasena s svojim uzročnikom *H. fraxineus* predstavlja trenutno najvažniji gorući problem zaštite šuma u Europi pa tako i u Hrvatskoj.

U Hrvatskoj prisutnost patogena *H. fraxineus* prvi puta je dokazano 2009. godine na običnom jasenu (*F. excelsior*) u području Gorskog kotara (Barić et al. 2012). Nekoliko godina prije zamijećeni su prvi simptomi sušenja i odumiranja običnog jasena na tom području. Sukladno rezultatima ovog istraživanja do danas bolest se proširila na čitavo gorsko i nizinsko područje, tj. područje rasprostranjenja običnog i poljskog jasena u Hrvatskoj, osim na područje mediterana na kojem prevladava crni jasen. U Europi ovaj se gljivični patogen smatra invazivnom vrstom (Husson et al. 2011; McKinney, Thomsen, Kjær, Bengtsson, et al. 2012). Tipični simptomi na domaćinu uključuju pojavu diskoloracija i venuće listova i peteljki, formiranje nekrotičnog tkiva na rahisima i kori mladih izbojaka, postepeno progresivno napredujući do faze produljenih nekrotičnih lezija tvoreći naposljetku otvorene rane na stabljici i diskoloracije unutarnjeg drva, te postepeno sušenje i odumiranje cijele krošnje (Lygis et al. 2006; Bakys et al. 2009; Kowalski & Holdenrieder 2009; Thomas Kirisits 2012; Gross et al. 2014). Postoje dva glavna načina primarne infekcije gljivičnog patogena *H. fraxineus*, prvi putem askospora iz apotecija koje inficiraju lišće i rahise domaćina nakon čega infekcija napreduje prema ligninoznom tkivu (Kirisits et al. 2009; Kräutler & Kirisits 2012), a drugi putem lenticela (Husson et al. 2012). Od 2009. godine *H. fraxineus* u Hrvatskoj je detektiran i izoliran u prirodnim sastojinama iz dvije od tri autohtone vrste jasena, običnog (*F. excelsior*) i poljskog jasena (*F. angustifolia*). Izolacije su uspješno obavljene iz većine njihovih staništa u Hrvatskoj, od nizinskih poplavnih šuma u blizini velikih rijeka do brdovitih, gorskih i planinskih područja. Patogena gljiva *H. fraxineus* podjednako napada sve

tri autohtone vrste jasena, iako se prvotno mislilo da je crni jasen (*F. ornus*) otporan na djelovanje patogena (Kirisits et al. 2009), testovima patogenosti, uključujući i nekim posebnim testovima obuhvaćenim ovim istraživanjem, utvrđeno je da crni jasen uspješno izbjegava infekcije u prirodnim sastojinama isključivo zbog klimatskih faktora mediteranskih područja viših temperatura koji su nepogodni za rast i razvoj gljive. Mogućnosti sterilizacije micelija gljive unutar sadnica izlaganjem djelovanju temperature od 36 °C tijekom vremenskog razdoblja od 5 h ili manje pri djelovanju viših temperatura je dokazao (Hauptman et al. 2013). Ugrožena su stabla svih dobnih razreda, mortalitet je veći u nižim dobnim razredima, otežano je prirodno pomlađivanje jasena, kao i proizvodnja zdravih sadnica jasena za pomlađivanje u rasadničarskoj proizvodnji. Usprkos svemu postoje određena soliterna stabla koja pokazuju određeni vid otpornosti na pojavu bolesti. Prema dosadašnjim istraživanjima nije poznato da ovaj uzročnik prouzročuje štete na drugim vrstama drveća osim na jasenu, stoga je bilo potrebno ocijeniti stupanj oštećenosti, te brzinu propadanja i širenja bolesti na teritoriju Republike Hrvatske.

Preživljavanje populacija osjetljivih jasenovih vrsta u budućnosti je iznimno ugrožena, zbog toga je izrazito potrebno otkriće dominantne individualne otpornosti pojedinih jasena, koja bi bila rezultat djelovanja različitih obrambenih mehanizama domaćina (McKinney et al. 2011; McKinney et al. 2012; Stener 2013). Takvo otkriće ima poseban značaj u šumarstvu jer bi postojanje individualne otpornosti odnosno smanjene osjetljivosti pojedinih jedinki jasena značio mogućnost preživljavanja i spas jasenovih sastojina selekcijom otpornih jedinki i njihovim međusobnim križanjem. To posebno dolazi do izražaja u klonskim sjemenskim plantažama poljskog jasena gdje bi sekundarna selekcija genetski superiornih klonova donijela ne samo genetski superiorno sjeme u vidu kvalitativnih i kvantitativnih svojstava drva već i genetski otporno sjeme domaćina na djelovanje patogena *H. fraxineus*. Sva dosadnja istraživanja individualne otpornosti rađena su na običnom jasenu, osim kratkoročnog istraživanja otpornosti slovenskih klonova poljskog jasena u zapuštenoj klonskoj sjemenskoj plantaži Hraščica u Republici Sloveniji (Hauptman 2013). Drugih istraživanja ovakvog tipa na poljskom jasenu gotovo da i nema, stoga je bilo od iznimne važnosti, kako za Hrvatsko šumsko gospodarstvo kao i za znanstvena saznanja o djelovanju patogena na poljski jasen, testiranje hrvatskih klonova poljskog jasena za svojstvo individualne osjetljivosti, otpornosti ili tolerancije.

## 1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja

Gljive su jedna od najvažnijih skupina organizama na svijetu, broj vrsta unutar tog carstva procijenjuje se od 1.5 (Hawksworth 2001) do čak 5.1 milijuna (Blackwell 2011). Suvremene molekularne analize gljivične DNA potvrđuju sve veće procjene varijabiliteta gljivičnih vrsta (O'Brien et al. 2005). Razlog tome leži u činjenici da su većina vrsta gljiva mikroorganizmi, te veći dio svog života provedu u obliku micelija skrivenog u biljnom tkivu, tlu ili nekom drugom supstratu. Veliki broj morfološki sličnih vrsta, varijabilnost intraspecijskih značajki, nemogućnost izolacije te razvoja plodnih struktura u laboratorijskim uvjetima, dodatno otežavaju identifikaciju. Sve navedno čini gljive skupinom u kojoj su za identifikaciju vrste nužne primjene molekularnih DNA metoda (Seifert 2009). Samo oko 17% vrsta gljiva se danas može uspješno uzgojiti u čistoj kulturi (Bridge & Spooner 2001), stoga je molekularnom detekcijom jedino moguće istraživati bioraznolikost određenih vrsta. Suvremene molekularne metode postaju nezaobilazne u početnim istraživanjima uzroka fizioloških slabljenja i odumiranja velikog spektra biljnih vrsta jer omogućuju identifikaciju gljiva bez dobivanja čistih kultura, pomoću selektivnog umnožavanja DNA u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) (Landeweert et al. 2003).

Bakys et al. (2009; 2011) molekularnim metodama iz odumrlih i asimptomatičnih izbojaka i simptomatičnog korijenja dobivaju spektar patogenih vrsta povezanih s sušenjem običnog jasena u Europi. Za određivanje potencijalnog uzroka odumiranja običnog jasena u Litvi, (Lygis et al. 2006) koriste molekularne DNA analize čistih kultura gljiva iz izbojaka i debala asimptomatičnih, simptomatičnih i potpuno odumrlih stabala. (Chandelier et al. 2010) razvija molekularnu metodu real time PCR-a, specifičnih početnica i Taqman sonde baziranoj na ITS regiji, radi brze i pouzdane detekcije patogena *Chalara fraxinea* iz drvnog tkiva. (Schoebel et al. 2014) razvija molekularnu metodu za detekciju mikovirusa unutar micelija patogena *C. fraxinea* zbog potencijalne pojave hipovirulencije domaćina.

Odumiranje sastojina može biti posljedica sinergijskog djelovanja više čimbenika, uključujući značajke klime i staništa, antropogenog utjecaja i štetnih organizama (Mueller – Dombois 1986). U posljednja dva desetljeća zabilježena je povećana pojava virulentnih infektivnih bolesti u prirodnim šumskim populacijama. Pojava dosad nezabilježenog broja novih gljivičnih bolesti dovela je do uzrokovanja jednog od najvećih odumiranja vrsta u povijesti, sve zahvaljujući intenziviranju disperzije gljivičnih bolesti (Fisher et al. 2012). Međutim, gljive imaju i nezamjenjivu ulogu u normalnom funkcioniranju šumskih ekosustava, sudjeluju u mobilizaciji, unosu i translokaciji nutrijenata (Steiner et al., 2004). Dokazano,

ektomikorizne gljive mogu doprinijeti poboljšanju rasta i povećanju otpornosti biljaka na patogene organizme (Van Wees et al. 2008).

Uspješna kolonizacija biljnog tkiva gljivičnim patogenom zahtijeva diferencijaciju specijaliziranih tipova stanica (Mendgen & Deising 1993). (Cleary et al. 2013) mikroskopskim pregledom lišća *F. excelsior* izloženom djelovanju askospora *H. fraxineus* otkrivaju rane stadije infekcije patogena, uključujući određene stadije morfogeneze, te formaciju infekcijskih struktura (apresorija). Adhezija na površini domaćina je preduvjet za gljivičnu infekciju, stoga su prepoznavanje i signalizacija površine substrata ključni za formiranje infekcijskih struktura (Nicholson, 1996). Neki mikovirusi iz roda *Hypovirus* (porodica Hypoviridae) i roda *Mitovirus* (porodica Narnaviridae) dokazano uzrokuju hipovirulenciju kod biljnih patogena (Nuss 2005). Inducirana mikovirusna hipovirulentnost dokazana je u slučaju uzročnika raka kore pitomog kestena, *Cryphonectria parasitica* (J J Polashock et al. 1997), te u slučaju uzročnika Holandske bolesti brijesta, *Ophiostoma ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* (Hong et al. 1999a).

Stadij genetske varijabilnosti gljiva je rezultat utjecaja klimatskih uvjeta, formacije i distribucije spora, te uspostave adaptacijskog kapaciteta za preživljavanje u različitim klimatskim uvjetima. Postoji velika ovisnost intrapopulacijskog varijabiliteta *H. fraxineus* i nadmorske visine gljivičnih izolata (Kraj & Kowalski 2014). Samo 10% istraživanih izolata *H. fraxineus* ima sposobnost rasta micelija pri temperaturi od 30 °C, dok je optimalna temperatura za rast ovog patogena 20 °C (Kowalski & Bartnik 2010). (Hauptman et al. 2013) istražuje osjetljivost *H. fraxineus* na temperaturu, te mogućnosti kontrole termo-sterilizacijom micelija gljive inficiranih sadnica *F. excelsior*.

### 1.1.1. Raširenost bolesti i oštećenost jasenovih sastojina u Europi

Prvi simptomi sušenja jasena pojavili su se po prvi puta u Europi 1992. godine u Poljskoj (Przybył 2002; Kowalski & Lukomska 2005), ubrzo zatim prvi simptomi pojavili su se i u Litvi (Lygis et al. 2006; Timmermann et al. 2011), nakon čega se bolest širi velikom brzinom pa su do danas pojavu bolesti objavili još i u Austriji (Cech 2006; Halmschlager & Kirisits 2008; Kirisits et al. 2009), Danskoj (Thomsen et al. 2007), Njemačkoj (Schumacher et al. 2007), Norveškoj (Talgo et al. 2009), Češkoj (Jankovský & Holdenrieder 2009), Mađarskoj (Szabó 2009), Francuskoj (Ioos et al. 2009), Švedskoj (Bakys et al. 2009), Švicarskoj (Engesser et al. 2009), Sloveniji (Ogris et al. 2009), Bjelorusiji (Timmermann et al. 2011; Kirisits et al. 2009), Rumunjskoj (Timmermann et al. 2011; Kirisits et al. 2009), Rusiji

(Timmermann et al. 2011; Kirisits et al. 2009), Estoniji (Drenkhan & Hanso 2010), Nizozemskoj (EPPO 2010), Italiji (Ogris et al. 2010), Latviji (Rytönen et al. 2011), Belgiji (Chandelier et al. 2011), Finskoj (Rytönen et al. 2011), Slovačkoj (Kunca et al. 2011), Hrvatskoj (Barić et al. 2012), Ujedinjenom Kraljevstvu Velike Britanije (EPPO 2012), Irskoj (EPPO 2013) i Ukrajini (Davydenko et al. 2013; EPPO 2013). Pojavnost prvih simptoma sušenja jasena u raznim državama Europe prikazana je slikom (Slika 2). U Hrvatskoj su prvi simptomi bolesti opaženi u svibnju 2009. godine u Gorskom kotaru u G.J. Belevine u sklopu NPŠO Zalesina Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U rujnu 2011. godine dobivene su prve izolacije patogena na poljskom jasenu međutim samo u graničnim rubnim područjima dodira ekoloških niša običnog i poljskog jasena (Pisarovinski lugovi, Jastrebarski lugovi i Donje Međimurje) (Barić et al. 2012). Tek u svibnju 2015. godine bolest se proširila te dobivamo prve pozitivne nalaze na poljskom jasenu u cijelom nizinskom području Hrvatske sve do krajnjeg istoka.

Kod svih gore navedenih država bolest se pojavila na običnom jasenu (*F. excelsior*) dok u Njemačkoj (Schumacher et al. 2007), Češkoj (Jankovský & Holdenrieder 2009), Sloveniji (Ogris, 2009), Austriji (Kirisits et al. 2010), Italiji (Montecchio, usmeno priopćenje), te Mađarskoj (Koltay et al. 2012) i Hrvatskoj (Barić et al. 2012), bolest je također prisutna i na poljskom jasenu (*F. angustifolia*). Štete uzrokovane patogenom *H. fraxineus* na crnom jasenu u prirodnim sastojinama u prirodnim klimatskim uvjetima vrste dosad nisu otkrivene, međutim na lisnim rahisima su pronađena plodna tijela patogena (Gross et al. 2014b), te unosom sadnica crnog jasena u sastojinu običnog jasena pod jakim infekcijskim pritiskom patogena pojavile su se infekcije na crnom jasenu (Kirisits & Schwanda 2015). Određen stupanj osjetljivosti crnog jasena dokazan je još ranije testovima patogenosti na različitim vrstama jasena (Kirisits et al. 2009). Sukladno prvim testiranjima neki testovi su pokazali da je poljski jasen nešto osjetljiviji na napad patogen od običnog jasena (Kirisits et al. 2009; Ogris 2009). Istraživanje u Estoniji dokazalo je da osim autohtonih vrsta jasena, osjetljivost na patogena pokazuju i neke druge alohtone vrste kao što su *F. nigra*, *F. pennsylvanica*, *F. americana* i *F. mandschurica* (Drenkhan & Hanso 2010).

Bolest se pojavljuje na jasenima različitih dobnih razreda, te u različitim sastojinama na različitim tipovima tla. Intenzivnost šteta je veća na stablima mlađih razvojnih faza, te na vlažnijim područjima s relativno niskim temperaturama. Izrazito je otežano pomlađivanje jasena, gotovo je onemogućeno dobivanje zdravih neinficiranih jasenovih sadnica iz šumskih rasadnika (Kirisits et al. 2009; Kowalski et al. 2012; Schumacher et al. 2010; Kirisits 2012).

Stabla starijih dobnih razreda su otpornija, zapravo su tolerantnija na razvoj bolesti jer imaju sposobnost dugo uspješno podnositi napad patogena. Vrlo se često dešava da ih bolest oslabi do te mjere da postanu osjetljivija na napad sekundarnih patogena i sekundarnih štetnika koji dodatno ubrzano pospješuju propadanje jasena (Bakys et al. 2011; Husson et al. 2012; Keßler et al. 2012; Kirisits & Freinschlag 2012; Kunca et al. 2011; Skovsgaard et al. 2010). U takve organizme najzastupljenije prvenstveno spadaju gljive iz roda *Armillaria* i jasenovi potkornjaci (Coleoptera: Scolitidae). Sve više ima i saznanja da neki od uzročnika koji sudjeluju u procesu propadanja jasena su i gljivama slični organizmi iz roda *Phytophthora* (Orlikowski et al. 2011), međutim postoje i podaci da su vrste iz roda *Phytophthora* uzročnici odumiranja jasena i na mjestima gdje gljiva *H. fraxineus* još nije ni prisutna (Akilli et al. 2013).

Nova bolest jasena dosad je najveće štete prouzročila na mjestima na kojima se bolest najranije pojavila, stoga je u Litvi na primjer 2009. godine 30 – 40 % jasenovih sastojina bilo predviđeno za čistu sječu (Lygis et al. 2009), površina jasenovih sastojina se od 1995. – 2011. godine smanjila s 50800 na 36300 hektara površine (Bakys 2013). Prema podacima iz stalnih istraživačkih ploha u Litvi godišnje odumire približno 10 % jasena (Pliura et al. 2012). Slično se je i u Latviji površina jasenovih sastojina od 2000. – 2007. godine smanjila za više od 5000 hektara odnosno 23 % (Kenigšvalde et al. 2010).

U okolnim susjednim državama Republike Hrvatske bolest još uvijek nije prouzročila takve drastične štete. U Austriji gdje je bolest prisutna od 2005. godine, oštećenost jasenovih sastojina detaljno se prati na 14 izabranih istraživačkih ploha u donjoj Austriji (Keßler et al. 2012). Prosječna oštećenost jasenovih krošanja, zbog patogena *H. fraxineus*, je 2008. godine u Austriji iznosila između 1 – 34 % (prosječno 11 %), godine 2010. između 2 – 38 % (prosječno 16 %). Mortalitet je bio nizak, te su od praćenih 280 stabala u potpunosti se osušila samo tri. U obzir treba uzeti da je monitoring obavljan u starim jasenovim sastojinama, te da je oštećenost mlađih sastojina kudikamo veća. Istraživanje u Bavarskoj je pokazalo da je 2012. godine istraživanje mortaliteta u odraslim starijim dobnim razredima jasenovih sastojina oko 2 %, u razvojnim fazama mladika oko 26 %, dok na površinama u pomlađivanju gotovo 43 % (Metzler et al. 2012.). U Sloveniji je bolest opažena prvi puta u jesen 2006. godine, te detaljnijih podataka o štetama jasena nije bilo iako podatak o količini posjećene drvne zalihe običnog i poljskog jasena zajedno pokazuje povećanu stopu sječe od 2004 godine do 2012. godine, kao i povećanu stopu sanitarnog sjeka od 2008. – 2012. godine (Hauptman 2013).

Patogen *H. fraxineus* osim svojih domaćina neposredno ugrožava i druge organizme. Tako su u Švedskoj zajedno s običnim jasenom na crvenu alarmnu listu ugroženih vrsta uvrstili i 60 drugih vrsta (većinom kukaca i lišajeva), koji o toj vrsti direktno ili indirektno ovise (Gärdenfors 2010, cit. po Bengtsson 2013). Istraživanja nadalje pokazuju da uzročnik nove bolesti jasena *H. fraxineus* radi veće konkurentnosi na zaraženim površinama istiskuje autohtonu prisutnu gljivu *Hymenoscyphus albidus*, za koju se spominje da je u određenim područjima već i nestala ili izumrla (McKinney et al. 2012).

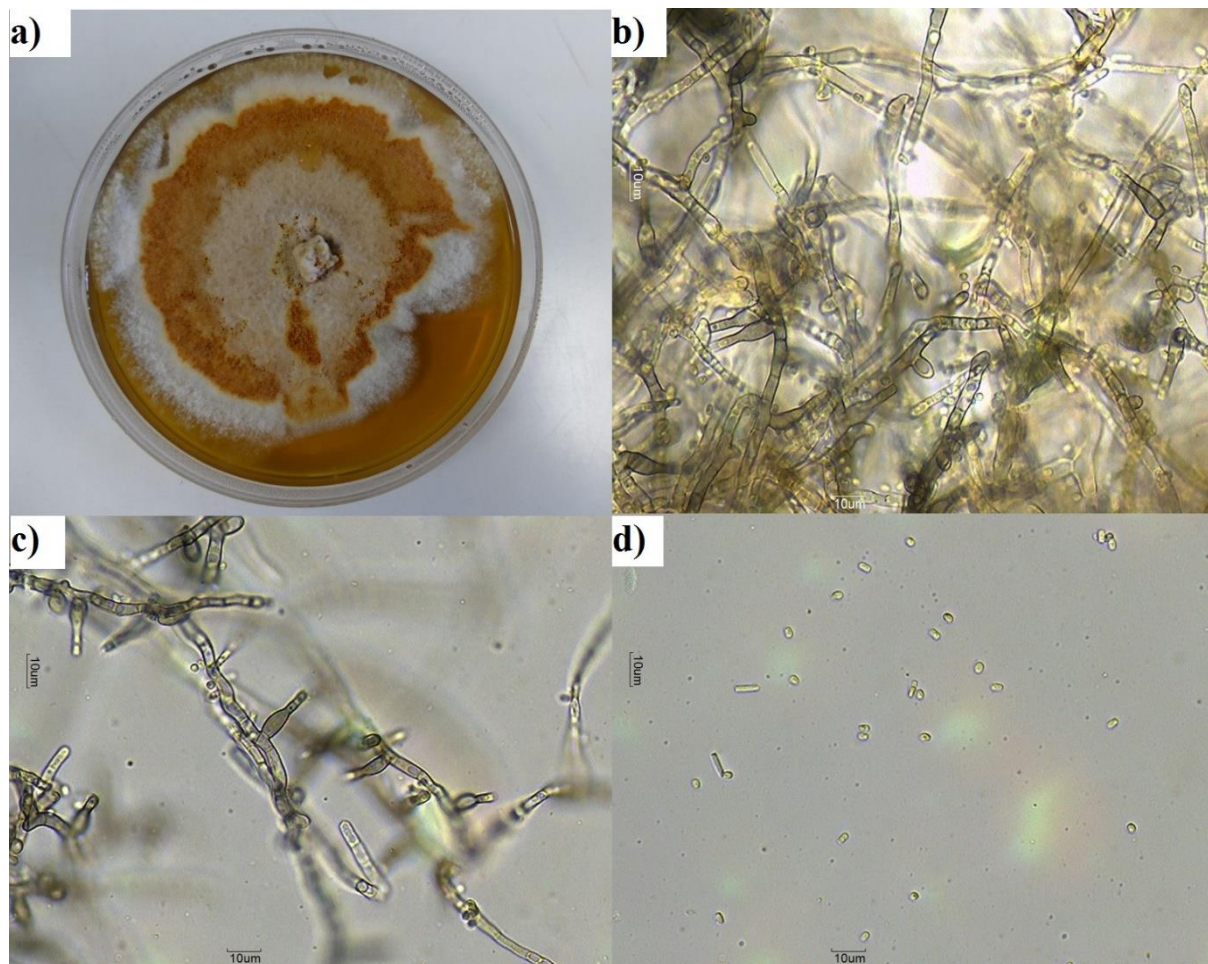
### **1.1.2. Gljiva *Hymenoscyphus fraxineus* uzročnik odumiranja jasena**

#### **1.1.2.1. Traženje uzročnika sušenja i otkriće nove vrste**

Intenzivno sušenje i odumiranje jasena u Europi započelo je još 1990.-ih godina (Przybył 2002; Kowalski & Lukomska 2005; Lygis et al. 2006), iako je gljiva uzročnik te pojave opisana tek 2006. godine. Prije toga kao glavni uzročnici propadanja jasena navodili su se abiotički faktori (smrzavanje, suša, velike nagle temperaturne oscilacije) koji su imali sposobnost slabljenja vitaliteta jasena do te mjere da su infekcije različitih slabih patogenih organizama bile dovoljne za potpuno sušenje i odumiranje jasenovih stabala (Przybył 2002; Pukacki & Przybył 2005). S odumiranjem jasena se povezivalo i djelovanje gljive iz roda *Armillaria* (Lygis et al. 2006), iako se kasnije pokazalo da djelovanje tih vrsta gljiva na jasenima oslabljenog vitaliteta sekundarnog značaja (Bakys et al. 2009). Iz oboljelih jasenovih tkiva uspješno su izolirane mnoge vrste među kojima su bile i pojedine blago patogene vrste pogotovo iz rodova *Cytospora*, *Diplodia*, *Fusarium* i *Phomopsis* (Przybył 2002; Kowalski & Lukomska 2005). Također je iz oboljelih jasena često bili izolirana, tada još nepoznata gljiva iz roda *Chalara* (Przybył 2002; T Kowalski 2006). Posebno velika je bila izolacija gljive iz svježeg tkiva koje je pokazivalo početni stadij infekcije, već je tada to ukazivalo da bi gljiva iz roda *Chalara* lako mogla biti uzročnik sušenja jasena. S njenim opisom i dokazom njene patogenosti to je i dokazano (Kowalski & Holdenrieder 2009a). U Hrvatskoj je gljiva prvi puta uspješno izolirana iz drvnog tkiva jasena 2009. godine (Barić et al. 2012) dok je njena patogenost uspješno dokazana 2014. godine.

Gljiva *C. fraxinea* stvara 16 – 24 µm duge fialide, u kojima se stvaraju konidije, koje se izlučuju u obliku lanca ili sluzastih kapljica (Slika 4). Prve konidije koje stvaraju fialide su veće, 6 – 7 x 2.2 – 2.5 µm, od konidija koje se stvaraju kasnije, 3.2 – 4.0 x 2.2 – 2.5 µm (T Kowalski 2006). U prirodi se spomenute konidiogene stanice (fialide) stvaraju pri nižim temperaturama u jesen, te najčešće na otpalim lisnim peteljka (Kowalski & Bartnik 2010),

rjeđe na izbojcima i deblu zaraženih jasena (Husson et al. 2012; Kowalski & Holdenrieder 2009a). Također pri uzgoju čistih kultura gljive izlaganje nižim temperaturama (5 – 15 °C) pospješuje sporulaciju gljive (Kirisits et al. 2009; Kowalski & Bartnik 2010).



Slika 4. a) kultura gljive *C. fraxinea*; b) micelij gljive *C. fraxinea*; c) fialide gljive *C. fraxinea*; d) konidije gljive *C. fraxinea*

Figure 4. a) culture of the fungus *C. fraxinea*; b) micelium of the fungus *C. fraxinea*; c) phialides of the fungus *C. fraxinea*; d) conidia of the fungus *C. fraxinea*

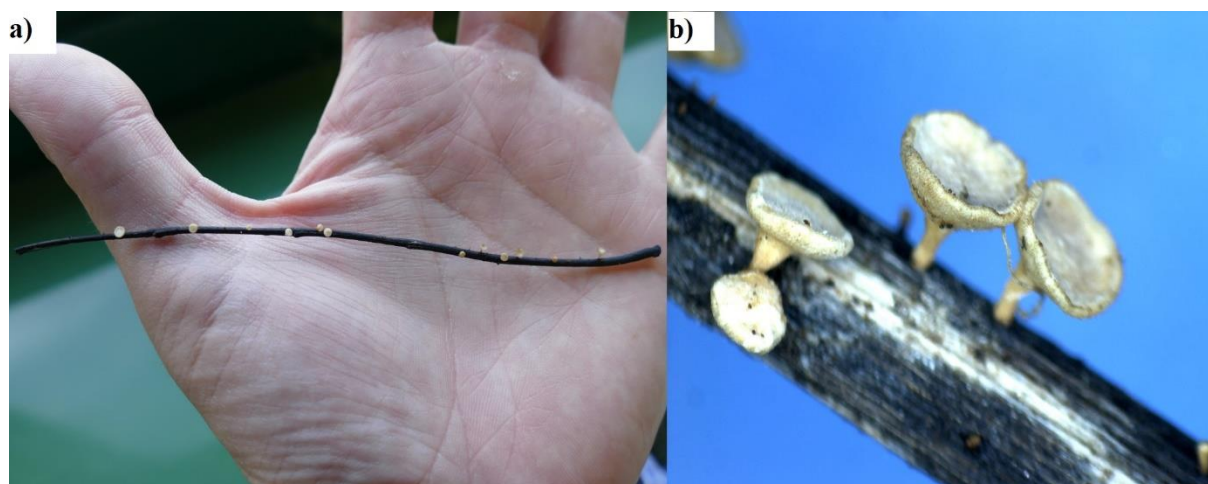
S otkrićem gljive *C. fraxinea* uzročnik sušenja jasena je bio pronađen, međutim ostalo je nejasno iznimno brzo širenje bolesti po čitavoj Europi. Konidije koje stvara gljiva *C. fraxinea* su ljepljive i sluzaste te na taj način ne omogućavaju brzo širenje patogena na velike udaljenosti, kao što je naprimjer širenje pomoću vjetra (T Kowalski 2006; Kowalski & Holdenrieder 2008). Kasnije je otkriveno da konidije *C. fraxinea* zapravo nisu konidije budući da nemaju mogućnost germinacije niti infekcije, već su to u biti spermacije koje imaju ulogu u izmjeni jezgri i fertilizaciji gljive (Kirisits et al. 2009). Budući da konidije nisu sposobne uzrokovati nove infekcije, daljnja istraživanja su pokazala da imaju izuzetno važnu ulogu u



razvojnem krugu gljive pri stvaranju teleomornog stadija (Gross et al. 2012b). Gljiva konidije u obliku lanca formira i naposredno nakon uspješne infekcije lista (Cleary et al. 2013).

### 1.1.2.2. Otkriće teleomorfa

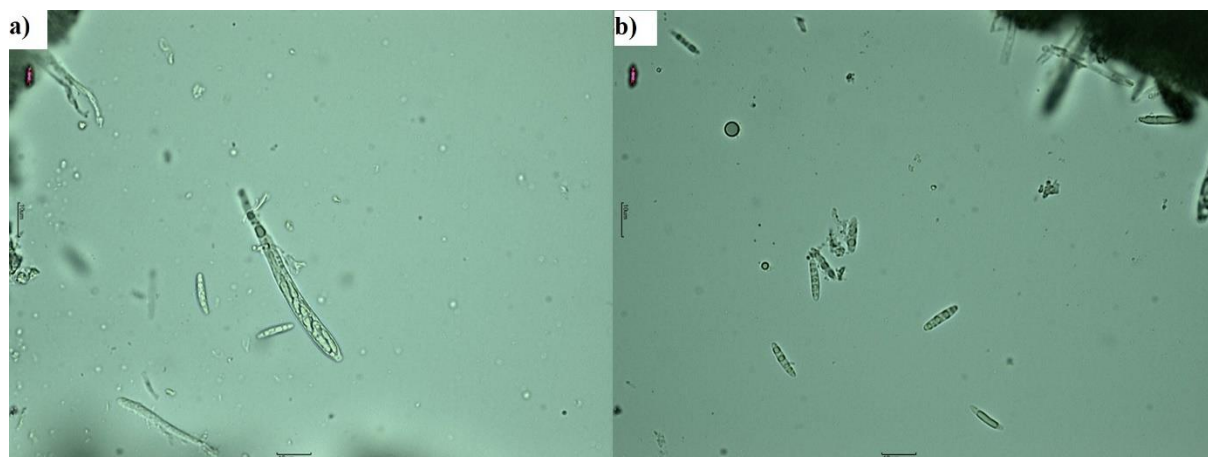
Naznake za postojanje teleomorfa gljive ukazivale su se već pri velikim morfološkim razlikama između čistih kultura gljive *C. fraxinea*, koje mogu nastati jedino u procesu mejotičke diobe odnosno spolnog razmnožavanja (Kirisits et al. 2009). Teleomorf uzročnika bolesti jasenovog sušenja je otkriven 2008. godine (Kowalski & Holdenrieder 2009b). Ponajprije su spolna plodišta, koja gljiva formira na otpalim lisnim rahisima iz prethodne vegetacijske godine, pripisali gljivi *Hymenoscyphus albidus* (Roberge ex Desm.) W. Philips, te su molekularne analize kasnije pokazale da se ipak radi o novoj vrsti gljive koja je nazvana *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C.R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T.N. Sieber & O. Holdenrieder (2011). Kasnije je 2014. godine ime promijenjeno u *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (2014) (Baral et al. 2014). U Hrvatskoj je teleomorf otkriven 2009. godine ubrzo nakon otkrića simptoma i izolacije anamornog stadija, pretpostavljalo se da se radi o vrsti *H. pseudoalbidus*, a ne o srodnoj vrsti *H. albidus* zbog prisutnih simptoma bolesti. Molekularnim je analizama i DNA ekstrakcijom potvrđena vrsta *H. fraxineus* iz plodnih tijela teleomornog stadija (apotecija) 2016. godine.



Slika 5. a) rahis otpalog lista običnog jasena (*F. excelsior*) s apotecijem gljive *H. fraxineus*; b) uvećanje apotecija gljive *H. fraxineus*

Figure 5. a) fallen leaf petiole of common ash (*F. excelsior*) with apothecium of fungus *H. fraxineus*; b) enlargement of the apothecium of fungus *H. fraxineus*

Trusišta gljive *H. fraxineus* su apoteciji (Slika 5) kod kojih promjer okruglog trusišta iznosi 1.5 – 3 mm, stručak je visine 0.4 – 2 mm. Trusišta su isprva bijele boje, kasnije krem bijele boje do žute, a u starosti smeđe boje. Stručak je pri dnu tamniji. Na mjestu gdje se stvaraju apoteciji je često oblikovana crna pseudosklerocijska ploča (Kowalski & Holdenrieder 2009b). U apotecijima se formiraju askusi dimenzija 80 – 107 x 8 – 10 µm (Slika 6), od kojih svaki u sebi sadrži osam askospora dimenzija 13 – 17 (21) x 3.5 – 5 µm (Kowalski & Holdenrieder 2009b).



Slika 6. a) askus s askosporama gljive *H. fraxineus*; b) askospore gljive *H. fraxineus*

Figure 6. a) ascus with ascospores of fungus *H. fraxineus*; b) ascospores of fungus *H. fraxineus*

Ponajprije se smatralo da je teleomorf uzročnika nove bolesti jasena morfološki identičan gljivi *H. albidus*. Daljnja istraživanja su pokazala da gljiva *H. fraxineus* u prosjeku formira veće askospore, kao što su i njena plodišta nešto većih dimenzija (Queloz et al. 2011; Solheim et al. 2011). Tipičan znak za razlikovanje spomenutih vrsta je prisutnost kuka (*eng. crozier*) koje gljiva *H. fraxineus* formira na bazi askusa, dok gljiva *H. albidus* ne (Zhao et al. 2012). Najveća razlika između ovih vrsta je ta da gljiva *H. albidus* ne formira nespolne organe odnosno anamorfnu oblik (Kirisits et al. 2013). Pretpostavka je da je *H. albidus* nepatogeni endofit, međutim testovi patogenosti koji bi potvrdili tu hipotezu još uvijek nisu obavljeni (Hietala & Solheim 2011).

### 1.1.2.3. Utvrđivanje porijekla gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

Nakon pronalaska teleomornog stadija gljive postavljene su hipoteze o izvoru bolesti (Kowalski & Holdenrieder 2009b; Jurc 2009). Brojni istraživači su smatrali da bolest uzrokuje invazivna alohtona gljiva (Husson et al. 2011; Queloz et al. 2011b; Timmermann et al. 2011). Kako je crni jasen smatran u to vrijeme otporan na bolest, te je srodan mnogim

azijskim vrstama jasena, pretpostavljalo se da je gljiva u Europu unesena iz Azije (Queloz et al. 2011b). Velika unutar vrsna raznolikost gljive, rađena na podlogi RAMS marker analiza (Kraj et al. 2012; Rytönen et al. 2011) nije potvrdila tu hipotezu, već je više ukazivala na mogućnost da je patogena populacija gljive nastala iz nepatogene populacije i to sigurno kao posljedica hibridizacije odnosno mutacije (Rytönen et al. 2011; Piškur 2010). Posve drukčija i manje vjerojatna je bila hipoteza koja je predviđala povećanje patogenosti gljive odnosno smanjenje otpornosti domaćina radi promjene okolišnih čimbenika. Zanimljiva je bila i spoznaja da testiranjem herbarijskih uzoraka u Švicarskoj se ispostavilo da je *H. fraxineus* bila prisutna u Švicarskoj minimalno desetljeće prije izbijanja prvih simptoma i manifestiranja bolesti (Hietala & Solheim 2011).

Nedavna istraživanja populacijske genetike gljive *H. fraxineus* na podlozi polimorfnih mikrosatelitskih markera su pokazale nisku genetsku varijabilnost između i unutar populacije gljive u Europi (Bengtsson et al. 2012; A. Gross, Grünig, et al. 2012). Rezultati su ukazivali na tzv. efekt osnivača (*eng. founder effect*) odnosno na to da je genetski relativno homogena populacija gljive *H. fraxineus* nastala iz u Europu unesenog manjeg dijela veće i genetski heterogene populacije gljive koja je sigurno prisutna negdje drugdje (Bengtsson et al. 2012). Vrsta *H. fraxineus* je heterotalična, te u inficiranom jasenovom lisnom rahisu može se lako otkriti i do osam različitih genotipova gljive (Gross et al. 2012). Ta saznanja trebala bi biti ključna da u relativno kratkom vremenskom periodu prisutnosti gljive u Europi jednostavno uz pomoć nekih molekularnih metoda dođemo do podataka o određenim stupnjevima raznolikosti u okviru vrsne raznolikosti gljive.

CARSTVO: *Fungi*  
ODJELJAK: *Ascomycota*  
PODODJELJAK: *Pezizomycotina*  
RAZRED: *Leotiomyces*  
PODRAZRED: *Leotiomycetidae*  
RED: *Helotiales*  
PORODICA: *Helotiaceae*  
ROD: *Hymenoscyphus*

Slika 7. Taksonomski položaj gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (Izvor: [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org))

Figure 7. Taxonomic classification of fungus *Hymenoscyphus fraxineus* (Source: [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org))

Na taj način su se pretpostavke da novu bolest jasena uzrokuje unesena alohtona gljiva ubrzo potvrdile. Istraživanja su otkrila da je vrsta *H. fraxineus* identična gljivi *Lambertella albida* (Gillet) Korf, koja se pojavljuje na peteljka vrste *Fraxinus mandshurica* u Japanu (Zhao et al. 2012). Rezultati istraživanja su pokazali također da je uvrštavanje gljive u rod *Hymenoscyphus* primjerenije nego uvrštavanje gljive u rod *Lambertella* (Slika 7). Populacija gljive *H. fraxineus* u Japanu je u usporedbi s europskom populacijom gljive genetski mnogo više raznolika, što je u skladu s teorijom efekta osnivača. U skladu s hipotezom, da gljiva najvjerojatnije potječe iz Azije, je i činjenica da su lokalne (azijske) vrste jasena otporne na pojavu bolesti. Neovisno o tome za detaljno utvrđivanje porijekla gljive *H. fraxineus* biti će potrebne daljnje genetske analize populacija iz različitih dijelova Azije (Zhao et al. 2012).

### 1.1.3. Razvojni ciklus i simptomi bolesti

Kako je već ranije spomenuto, apoteciji se formiraju na otpalim prošlogodišnjim lisnim rahisima, rjeđe se pojave na izbojcima i tanjim granama (Kowalski & Holdenrieder 2009b; Kirisits & Cech 2009). Važnu ulogu u razvoju apotecija kao i otpuštanju askospora ima vlaga (Cleary et al. 2013; Gross et al. 2012; Kirisits et al. 2009; Timmermann et al. 2011). Istraživanja u Norveškoj su pokazala da je koncentracija spora u zraku najveća između šest i osam sati ujutro. To je bitno za gljive koje aktivno prazne svoja plodišta (Hietala et al. 2013; Timmermann et al. 2011). Askospore najvjerojatnije sazrijevaju po noći ako za to postoji preduvjet dovoljne količine vlage, upravo iz tog razloga jutarnja rosa je glavni preduvjet dovoljne zračne vlage u trenutku pražnjenja plodišta koja ima i ulogu čuvanja spora od isušivanja, te na taj način omogućava nove infekcije. Vrijeme pojave apotecija je ovisan o zemljopisnoj širini, nadmorskoj visini te klimatskim odnosno vremenskim razmjerima (Kräutler & Kirisits 2012; Timmermann et al. 2011). Većinom se teleomrfna plodišta formiraju između lipnja i rujna. U Sloveniji i Austriji se ovisno o vremenskim uvjetima mogu pojaviti već u svibnju odnosno nekada ih je moguće naći i u listopadu (Cleary et al. 2013; Hietala et al. 2013; Kirisits et al. 2009; Ogris 2009; Timmermann et al. 2011).



Slika 8. a) početak nekroze lista običnog jasena koju je prouzročila gljiva *H. fraxineus*; b) progresija bolesti iz lista u izbojke običnog jasena, potpuno sušenje lista

Figure 8. a) necrosis formation on common ash leaf; b) progression of the disease from leaf into the shoots, total leaf dieback

Ubrzo nakon otkrića teleomorfa pojavile su se pretpostavke da su mjesta primarnih zaraza jasena većinom lisni rahisi domaćina, te da te infekcije rahisa su odgovorne za formiranje apotecija i askospora koje onda na veće udaljenosti rasijava vjetar (Kirisits et al. 2009; Timmermann et al. 2011). To je potvrdilo i Švedsko istraživanje (Cleary et al. 2013). To istraživanje je pokazalo da askospore na površini lista kliju, proključale hife zatim u dodiru s lisnom površinom oblikuju apresorije koji potom stvaraju sluzastu tvar koja djelovanjem enzima omekša kutikulu lista, na način da prodorna hifa pritiskom na kutikulu lista probija kutikulu i staničnu stijenku i prodre u unutrašnje lisno tkivo. Hife međustanično pridolaze kroz točkaste rupice u kutikuli lista i naseljavaju sve tipove stanica. Rezultat tih infekcija su nekroze lišća i lisnih peteljka, te rahisa (*slika x*) i takvo inficirano lišće prerano otpada sa stabla.





Slika 9. Gljiva *H. fraxineus* uzrokuje nekrozu kore

Figure 9. Fungus *H. fraxineus* causes bark necrosis



Slika 10. Diskoloracija drva, uzročnik *H. fraxineus*

Figure 10. Wood discoloration caused by *H. fraxineus*

Gljiva se iz lišća odnosno lisnih rahisa širi u izbojke i grančice (Slika 8), međutim postotak infekcije lista koja naposljetku prouzroči infekciju izbojaka relativno nizak (Kräutler & Kirisits 2012). Većina inficiranog lista bi prijevremeno otpala, prije nego bi se gljiva uspjela proširiti na izbojak. U proučavanju kolonizacije drva (inokulacijom izbojaka trogodišnjih jasenovih

sadnica) je utvrđeno da gljiva od ulaznog mjesta intracelularno raste u sva tkiva i svim smjerovima, te da povremeno oblikuje unutarhifne hife (Dal Maso et al. 2012; Schumacher et al. 2010). Ista istraživanja su dokazala da se gljiva vrlo brzo širi uzdužno unutar debla, najbrže po provodnim sistemima i unutrašnjem drvu odnosno srži. Istovremeno se nešto sporije radijalno širi prema van odnosno prema kambiju i kori gdje stvara preduvjete za razvoj brojnim drugim gljivama. Upravo zbog razvoja drugih gljiva je uspješnost izolacije gljive *C. fraxinea* iz kore kudikamo manja od uspješnosti izolacije iz drva. U skladu s spomenutim načinom širenja slažu se i drugi autori i istraživanja, kao i nama najbliži u susjednoj Sloveniji (Ogris et al. 2009a). Nakon inokulacije gljive *C. fraxinea* u grančice jasena, nekroze u drvu su bile značajno veće od nekroza kore. Na izbojcima, grančicama i deblima gljiva prouzrokuje nekroze kore (Slika 9) i diskoloraciju drva (Slika 10), što naposljetku prouzroči sušenje lista i odumiranje krošnje (Slika 11). Domaćin na infekciju i oštećenja krošnje često reagira oblikovanjem adventivnih izbojaka. Istraživanja u Švedskoj su pokazala, da je gljiva sposobna se širiti u drvu tijekom cijele godine, također u periodu kada je temperatura bila dva mjeseca ispod 0 °C (Bengtsson 2013). Ako se domaćin uspješnije odupire prorastanju gljive, tada se na inficiranim izbojcima i grančicama formiraju rak rane. Rast gljive na domaćinu i s tim nastanak rakastih tvorevina također mogu prouzročiti druge gljive, koje u inficiranim jasenovim tkivima zaustavljaju ili usporavaju rast i zamijenjuju gljivu *C. fraxinea*, iako same nisu u mogućnosti kolonizirati zdravo jasenovo tkivo (Bengtsson 2013).

Značajnu ulogu pri širenju gljive u tkivima domaćina imaju vjerojatno i njeni sekundarni metaboliti. Gljiva proizvodi fungistatičnu tvar viridin, koju lako pretvori u fitotoksičnu tvar viridiol (Grad et al. 2009; Andersson et al. 2010; Andersson et al. 2013). Viridiol je u tim istraživanjima na sadnicama običnog jasena prouzročio simptome, koji su bili posve identični simptomima, koje ih prouzrokuje gljiva *H. fraxineus*. Najaktualnija israživanja ukazuju na to da viridiol nije najvažniji uzročnik virulentnosti gljive *H. fraxineus* (Junker et al. 2014). Korelacije između koncentracije viridiola, koji su ih u kulturama proizveli različiti izolati gljive, i patogenosti istih izolata nisu otkrivene. Bez obzira na to, gljiva proizvodi najvjerojatnije neke druge tvari koje značajno utječu na patogenost gljive (Junker et al. 2014). Uzročnik jasenovog sušenja dokazano proizvodi i neke druge steroide i steroidima slične tvari, iako njihovi možebitni toksični utjecaji još nisu istraženi (Andersson et al. 2013; Andersson et al. 2012; Bengtsson 2013). Patogen proizvodi također do sada nepoznate sekundarne metabolite koji su najvjerojatnije značajni samo za vrstu *C. fraxinea* (Pham et al.



2013). Gljiva *H. fraxineus* ima također i određenu mogućnost razgradnje drva (Schumacher et al. 2010).



Slika 11. Odumiranje krošnje običnog jasena zbog djelovanja gljive *H. fraxineus*

*Figure 11. Crown dieback of common ash caused by *H. fraxineus**

Nekroze izbojaka i grana se većinom šire iz uzdužnih brazgotina nekrotičnih rana u bazi lisnih pupova na koje je bilo pričvršćeno inficirano lišće. Moguće je također pronaći nekroze koje nisu povezane s lisnim pupovima, već su to nekroze nastale infekcijom pomoću askospora koje su zarazile izbojke neposredno, a ne samo direktno preko lišća (Kirisits et al. 2009). Istraživanje u Francuskom pokazuje da gljiva *H. fraxineus* uzrokuje nekroze i na korijenu



stabala (Husson et al. 2012). Pretpostavlja se da patogena gljiva u tim primjerima domaćina inficira kroz lenticle u kori.

Gljiva na otpalim inficiranim lisnim rahisima formira značajnu crnu pseudosklerocijsku ploču, u obliku koje prezimljava (Gross et al. 2012; Kowalski & Holdenrieder 2009b). Jaseni na inficiranim peteljka formiraju fialide koje formiraju konidije. One imaju u procesu spolnog razmnožavanja funkciju spermacija i tako sudjeluju u procesu razvoja apotecija koji sljedeće proljeće formiraju askospore. Broj apotecija koji se razvijaju na zaraženim područjima je velik. Tako su u Norveškoj na jednom m<sup>2</sup> površine nabrojali i do 8300 plodišta (Hietala et al. 2013).

#### **1.1.4. Mogućnosti suzbijanja gljive *Hymenoscyphus fraxineus***

Mogućnosti za suzbijanje odnosno kontroliranje nove bolesti jasena su vrlo ograničene (Kirisits & Freinschlag 2012; Kirisits et al. 2009). Širenje gljive uz pomoć čovjekove djelatnosti vrlo lako spriječimo zabranom premiještanja inficiranog biljnog materijala, međutim patogen se jako učinkovito i brzo širi askosporama zrakom uz pomoć djelovanja vjetra (Pautasso et al. 2013). Da bi se smanjio inokulum, moguće je na urbanim površinama i u rasadnicima inficirano lišće prije pojave apotecija skupiti te ga potom zakopati u tlo ili spaliti (Barić et al. 2012; Kirisits et al. 2009). U rasadnicima pri proizvodnji sadnica, u urbanim sredinama, pri zaštiti važnih (zaštićenih) stabala ili na razmjerno manjim površinama gdje je eradikacija bolesti možda još uvijek moguća, bi za suzbijanje gljive mogli upotrebljavati fitofarmaceutska sredstva. Istraživanja o učinkovitim fungicidima koji suzbijanju gljivu *H. fraxineus* zapravo i ne postoje te se tom problematikom djelomično bavio (Hauptman 2013). U tom istraživanju, od sistemskih fungicida, aktivna tvar karbendazim u sredstvu Bavistin bila jedina uspješna u svim testovima kontrole patogena, dok je druga manje uspješna bila aktivna tvar imidazol u sredstvu Octave. Od kontaktnih protektivnih fungicida najuspješnije su aktivne tvari klorotalonil i tiram, a najbolja je kombinacija kontaktnih protektivnih fungicida s sistemskim fungicidima gdje je najveći učinak polučila kombinacija klorotalonila s karbendazimom (sredstvo Daconil plus) (Hauptman 2013). Međutim postoje istraživanja koja se bave kemijskim suzbijanjem drugih gljiva koje kao i uzročnik jasenovog sušenja *H. fraxineus* spadaju u red Helotiales.

Iz spomenute skupine gljiva kao patogen šumskog drveća među najpoznatijim je gljiva *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet. Istraživanje u Španjolskoj je pokazalo da tu gljivu najuspješnije suzbija aktivna tvar klortalonil odnosno kombinacija aktivnih tvari klortalonil i

karbendazim (Santamaría et al. 2007). Upotreba samo klorotalonila odnosno klorotalonila u kombinacija s drugom aktivnom tvari predlažu i neka ranija američka istraživanja (Hopkin & McKenney 1995; Skilling et al. 1984). Uzročniku sušenja jasena srodna je i gljiva *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx, koja uzrokuje lisnu pjegavost trešnje u susjednoj Sloveniji gdje najveću štetu prouzrokuje upravo u šumskim rasadnicima (Jurc 2000). Kroz povijest su se protiv ove bolesti upotrebljavala i još se upotrebljavaju razna sredstva (Holb et al. 2010). Neka od tih sredstava odnosno aktivne tvari u njima su u međuvremenu zabranjene zbog prevelikog utjecaja na okolinu, a neka sredstva se više ne upotrebljavaju zbog nedjelotvornosti zbog razvitka otpornosti gljive. Većina istraživanja preporuča upotrebu aktivnih tvari benomil, dodin, bitertanol, mankozeb i prokloraz, međutim danas je u Hrvatskoj dozvoljena upotreba samo sredstvima s aktivnom tvari mankozeb i prokloraz (Ministarstvo poljoprivrede 2017). Neke gljive iz roda *Helotiales* uzrokuju štete u voćarstvu. Svakako treba spomenuti gljive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *Monilinia fructigena* Honey i druge uzročnice voćnih truleži (*Monilinia* spp.). Iz popisa registriranih sredstava za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj lako utvrdimo da se za suzbijanje gljive *B. fuckeliana* upotrebljavaju sredstva s aktivnom tvari boskalid i pirimetanil, za suzbijanje gljive *M. laxa* aktivne tvari difenkonazol, prokloraz, fenheksamid, tiofanat-metil, i neka sredstva na osnovi bakra (bakar hidroksid, bakar oksiklorid, bakar oksid, bordoška juha i tribazični bakreni sulfat), za suzbijanje gljive *M. fructigena* su registrirana sredstva s aktivnim tvarima fenheksamid, tiram i penkonazol, za ostale vrste roda *Monilinia* se koriste sredstva s aktivnim tvarima ciprodinil, iprodion, fenheksamid i kaptan (Ministarstvo poljoprivrede 2017).

Za suzbijanje prije spomenute gljive *Blumeriella jaapii* se upotrebljava i urea (Bengtsson et al. 2006; Green et al. 2006). Slično kao i kod sušenja jasena u razvojnem krugu lisne pjegavosti trešnje značajnu ulogu imaju plodišta, koja se u proljeće razvijaju na otpalom inficiranom lišću. Nanošenje uree na otpalo inficirano lišće pospješuje razgradnju lista i posljedično u proljeće smanjuje produkciju konidija i askospora (Green et al. 2006). Urea se također upotrebljava za suzbijanje mrljavosti lista i krastavosti plodova jabuke (Sutton et al. 2000) koje uzrokuje gljiva *Venturia inaequalis* (Cook) Wint. i također kod gljive *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., koji je jedan od naopasnijih patogena kod četinjača (Johansson et al. 2002). Kod gljive *Heterobasidion annosum* se ne tretira lišće odnosno iglice domaćina već se tretiraju panjevi nakon sječe.

Gljive odnosno drugi organizmi koji pokazuju antagonizam prema određenom patogenu, mogu se upotrebljavati za biološko suzbijanje. Tako na primjer za suzbijanje gljive *Heterobasidion annosum* panjeve četinjača umjesto ureom pošpricamo sa sporama gljive *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich (Agrios 1997). Gljivu *H. fraxineus* u inficiranim jasenovim tkivima navodno lako zamijene i spriječe njeno širenje drugi mikoorganizmi (Kowalski & Holdenrieder 2009a; Bengtsson 2013). Iz inficiranih jasenovih tkiva su osim gljive *H. fraxineus* izolirane i brojne druge gljive (Bakys et al. 2009a; Bakys et al. 2009b; Bakys et al. 2011; Davydenko et al. 2013; Kowalski & Holdenrieder 2009a; Kowalski & Lukomska 2005; Lygis et al. 2006; Przybył 2002). Najčešće su to bile gljive iz rodova *Alternaria*, *Phomopsis*, *Epicoccum* i *Diplodia*. Interakcije između tih organizama još uvijek nisu detaljno istražene, međutim kod testova dviju kultura između *H. fraxineus* i određenih drugih gljiva formiraju inhibicijske zone (Kowalski & Bartnik 2010; Kowalski & Holdenrieder 2009a). Prirodni antagonisti gljive stoga po svoj vjerojatnosti postoje, pitanje je samo dali je moguće navodne antagoniste uspješno iskoristiti za namjene biološke kontrole nove bolesti jasena. Od 19 testiranih vrsta gljiva 13 je više ili manje uspješno preraslo kolonije gljive *H. fraxineus*, dvije gljive su tvorile inhibicijske zone s *H. fraxineus*, te u dva primjera su kolonije *H. fraxineus* nadjačale i prerasle kolonije drugih gljiva (Hauptman 2013). Najveću mogućnost preraštanja i uništavanja kolonija *H. fraxineus* pripisuje se vrsti *Hypocrea* sp. (anamorf *Trichoderma* sp.) (Hauptman 2013).

S obzirom na to da gljiva *H. fraxineus* ima mogućnost proraštanja tkiva domaćina i pri temperaturama nižim od 0 °C (Bengtsson 2013; McKinney et al. 2012b), te da formira konidije u jesen pri niskim temperaturama (Gross et al. 2012b; Kowalski & Bartnik 2010), možemo reći da o vrsti koja je dobro prilagođena na niske temperature. Suprotno od toga su istraživanja u Poljskoj pokazala da je rast gljive pri 30 °C znatno ograničen (Kowalski & Bartnik 2010). Slovenska istraživanja na terenu potvrđuju da je intenzivnost bolesti viša na zasjenjenim mjestima s relativno nižim temperaturama (Ogris 2008). Sva ta istraživanja ukazuju na to da bi za suzbijanje bolesti jasena lako mogli upotrijebiti toplinu. Istraživanje u Sloveniji je pokazalo da 10 satno izlaganje temperaturi od 36 ili 40 °C uzrokuju potpunu eradikaciju gljive iz zaraženih sadnica odnosno inficiranih jasenovih tkiva, temperatura od 36 °C pri 5 satnom izlaganju je dovoljna da eradificira gljivu i da kultivacija gljive iz tkiva više nije moguća ili je drastično smanjena, a da se zadrži visoka stopa preživljavanja biljaka (Hauptman et al. 2013).

Toplinsko tretiranje se često upotrebljava za suzbijanje biljnih bolesti i štetnika. Postupak sušenja drva u komori (eng. *kiln drying*) se na primjer prije preseljenja upotrebljava za drvo i drveni pakirni materijal. Često se toplinski tretira i različite pridanke (cvijeće, voće i povrće) prije pohranjivanja (Lurie 1998). Toplina se upotrebljava i za sterilizaciju supstrata tla pred sjetvu odnosno sadnjom određenih biljaka (Agrios 1997). Toplinski se obrađuje i biljni reprodukcijski materijal odnosno žive biljke. U šumarstvu je najpoznatiji primjer obrade žira u toploj vodi u svrhu suzbijanja gljive *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald (Delatour & Morelet 1979; Delatour et al. 1982; Knudsen et al. 2004; Schroder 2002). Toplinska obrada s vodom se upotrebljava još i za suzbijanje različitih štetnika i bolesti vinove loze (Waite & May 2005; Waite & Morton 2007), isto tako s toplom odnosno vrućom vodom vrši se suzbijanje gljive *Rosellinia necatrix* Prillieux te na taj način štite korijenske sustave japanskih kruški (Eguchi et al. 2008).

Svjetlost u prirodi predstavlja važan čimbenik kao nositelj informacija. Molekularni sustavi prevodeći svjetlosnu elektromagnetsku energiju (fotone) u kemijski jezik stanica odašilju vitalni signal za prilagodbu virtualno svakog živog organizma na njegovo stanište (Tisch & Schmoll 2010; Rodriguez-Romero et al. 2010). Istraživanja su pokazala da gljive na svjetlost reagiraju na različite načine, te iniciraju značajne adaptacije u svojim metaboličkim putevima na rastu u svijetlu ili nakon percepcije svjetlosnog pulsa. (Tisch & Schmoll 2010). Isto istraživanje je pokazalo da alteracije kao odgovor na svjetlosni signal se prvenstveno opažaju u karotenoidnom metabolizmu, polisaharidnom i karbohidratnom metabolizmu, metabolizmu masnih kiselina, nukleotidnom i nukleosidnom metabolizmu, te njihovoj regulaciji u produkciji sekundarnih metabolita. Također, transkripcija gena započinje samo nekoliko minuta nakon izlaganje svjetlosti, prilagođava se ogroman nalet i aktivnost metaboličkih enzima, te naposljetku nivoi metabolita se mijenjaju da bi se nosili s štetnim čimbenicima svjetlosti, ili da se pripreme na reprodukciju, koja je zavisna o svjetlosti na mnogo načina. Mnoga istraživanja govore o fungicidnim ili fungistatičnim efektima ultravioletne svjetlosti (Özçelik 2007; Inglis et al. 1995; Idnurm & Heitman 2005; Nakamura et al. 2002; Valero et al. 2007). Brojna istraživanja istražuju UV svjetlost kao način kontrole gljive, i njezine fruktifikacije (Valero et al. 2007; Nakamura et al. 2002; Inglis et al. 1995). Istraživanja pokazuju i adaptaciju patogenih gljiva na stres izazvan izlaganjem različitim stresnim čimbenicima uključujući i izlaganje svjetlostnim uvjetima (Brown et al. 2014). Dok je osjetilo za svjetlost kod biljaka od krucijalne važnosti da bi mogle optimizirati svjetlosno-ovisnu konzervaciju energije, kod nefotosintetskih organizama sinkronizacija biološkog sata na

duljinu dana je važna funkcija (Rodriguez-Romero et al. 2010). Filamentozne gljive upotrebljavaju svjetlosni signal kao indikator izloženosti hifa na zrak te prilagođavaju svoju fiziologiju na tu situaciju ili induciraju morfogenetičke puteve (Rodriguez-Romero et al. 2010). Istraživanja govore da ovisno o uvjetima površine i vremenu izlaganja mikroorganizama UV svjetlosti ovisi uspješnost sterilizacije, tako je UV svjetlost (254 – 354 nm) u vremenskom periodu od 45 min dovoljna za sterilizaciju laboratorijskih alata od kvasaca, bakterija i gljiva, dok kod plijesni je potrebno i do 75 min osim kod površina s mediumom (Özçelik 2007). Istraživanje na blue/UV svjetlosti utvrđuje specifične gene kod gljiva koji reguliraju i kontroliraju metabolizam gljive i njezinu prilagodbu na djelovanje svjetlosti na način da brisanjem BWC1 i BWC2 gena reducira rast i virulentnost patogene gljive *Cryptococcus neoformans* (Idnurm & Heitman 2005). Isto istraživanje dokazuje da uloga blue/UV svjetlosti u kontrolnom razvoju je prastari proces koji je stariji čak i od razdvajanja gljiva u red ascomycetes i basidiomycetes.

Gljivični virusi (mikovirusi) se uobičajeno pronalaze u svim glavnim grupama biljnih patogenih gljiva. U devetom ICTV izvještaju (International Committee on Taxonomy of Viruses) izlistano je preko 90 mikovirusnih vrsta (Faquet et al. 2005; King et al. 2012). Većina gljivičnih virusa su dvo-lančani RNA virusi (Ghabriel and Suzuki, 2008; Mahy and Van Regenmortel 2009). Dok većina njih nema nikakvog poznatog utjecaja na domaćina, neki od tih virusa uzrokuju oslabljujuće bolesti ili uzrokuju redukciju virulentnosti u njihovim gljivičnim domaćinima (Pearson et al. 2009). Mikovirusna inducirana hipovirulentnost je već dokazana kod uzročnika raka kestenove kore, gljiva *Cryphonectria parasitica* (Anagnostakis 1982; Milgroom & Cortesi 2004; Polashock & Hillman 1994; J J Polashock et al. 1997), kod uzročnika holandske bolesti brijesta, gljive *Ophiostoma ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier 1983; Hong et al. 1999b), kod sive plijesni, *Botrytis cinerea* (Rodriguez-Garcia et al. 2014; Wu et al. 2007), te kod gljive *Sclerotinia homeocarpa* (Deng et al. 2003; Zhou & Boland 1997). Do danas, mikovirusi iz roda *Hypovirus* (porodica Hypoviridae) i *Mitovirus* (porodica Narnaviridae) uzrokuju hipovirulentnost u biljnim patogenima (Nuss 2005). Tip vrste iz roda *Hypovirus* je *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1), vjerojatno najistraživaniji virus biljnih patogenih gljiva (Dawe & Nuss 2001). Aplikacija hipovirusa kao agenta biokontrole protiv raka kore pitomog kestena je intenzivno istraživana kako u SAD-u (Anagnostakis 1982; Nuss 1992) tako i u Europi (Rigling 1994; Prospero & Rigling 2013). Sukladno istraživanju upotrebom RNAseq identificirane su virusne sekvence u dva gljivična izolata (Schoebel et al. 2014). Usporedbom sekvenca amino kiselina, u istom istraživanju, identificiran je mikovirus

kao pretpostavljeni novi član roda *Mitovirus* (porodica Narnaviridae) koji je nazvan *Hymenoscyphus fraxineus mitovirus* 1 (HfMV1). Novi mitovirus je jako varijabilan između europskih izolata i izgleda da se brzo mijenja, što je vrlo obećavajuće za buduća istraživanja i potragu za primjerenim sojom za upotrebu u mjerama biološke kontrole (Schoebel et al. 2014).

### **1.1.5. Individualna otpornost jasena**

U zaraženim gustim jasenovim sastojinama pojavljuje se veći broj jače oštećenih stabala dok među njima se pojavljuju i jedinke koje su s vrlo malim oštećenjima (Kirisits et al. 2009; McKinney et al. 2011; Stener 2013). To je ukazivalo da među nekim jedinkama postoje razlike u otpornosti na novu bolest jasena. Zbog toga što navodna individualna otpornost predstavlja možda jedino pravo rješenje za preživljavanje jasenovih sastojina u europskim šumama, na tu se temu u zadnjih nekoliko godina naredalo mnogo istraživanja.

Većinom su se istraživanja temeljila na individualnoj otpornosti pojedinačnih svojstava u klonskim sjemenskim plantažama običnog jasena *F. excelsior* (McKinney et al. 2011). U istom istraživanju su u periodu između 2007. – 2009. godine popisivali oštećenje rameta pojedinačnih klonova usljed djelovanja gljive *H. fraxineus*. Rezultati su pokazali statistički značajne razlike u oštećenosti između pojedinim klonovima, što znači da je otpornost genetski uvjetovana. Ustanovili su jaku korelaciju između oštećenosti klonova i otpadanja lista u jesen. Klonovi koji su bili zdraviji su u prosjeku u jesen ranije odbacivali list. Klonovi s manjim oštećenjima se stoga na neki način brane od zaraze gljivom da ranije odbace inficirani list, prije nego li se gljiva uspije raširiti u izbojke i grančice stabla. Primijetili su i drugi istraživači da se stupanj oštećenosti svake godine kod nekih klonova povećava brže nego kod drugih, što je ukazivalo na to da određena svojstva domaćina nakon infekcije utječu na rast gljive. Izvedbom inokulacije gljive *H. fraxineus* u grančice različitih klonova te motrenjem posljedično prouzrokovanih nekroza je kasnije to i dokazano (McKinney et al. 2012b). Otpornije jedinke dakle izbjegnu bolest s ranijim otpadanjem lista ili s aktivnim obrambenim mehanizmima, koji ometaju širenje gljive *H. fraxineus* u tkivima domaćina.

Slična istraživanja su odrađena i u Austriji (Kirisits & Freinschlag 2012) te u Švedskoj (Stener 2013) te su i ona potvrdila razlike u otpornosti svojstava običnog jasena. Također (Stener 2013) potvrđuje korelaciju među odbacivanjem lista u jesen i stupanj oštećenosti pojedinih klonova. Tome treba nadodati da su, slično kao i u Danskoj, otpadanje lista ocjenjivali na podlozi promjene boje lista. Kada su oštećenost pojedinih klonova usporedili s

pojavom prerano otpalog lista (usljed djelovanja infekcije s gljivom *H. fraxineus*) dobiveni su sasvim suprotne rezultate. Klonovi koji su bili jače oštećeni su puno ranije i intenzivnije odbacivali inficirani list. U Austriji jasne povezanosti između odbacivanjem inficiranog lista i intenziteta oštećenja nisu otkrivene (Kirisits & Freinschlag 2012). U Danskoj su proučavali i korelaciju između vremena prolistavanja i oštećenjem jasena (Bakys et al. 2013; McKinney et al. 2011). Ustanovili su da su jaseni koji ranije listaju u proljeće otporniji na bolest. To ukazuje na činjenicu da je mlađe lišće za infekcije osjetljivije nego starije. Istraživanja koja su bila rađena na istom klonskom materijalu, ali na različitim lokacijama, su ukazale, da okolina ne utječe na otpornost, već otpornost opada s opadanjem rasnog potencijala odnosno vitalnosti stabala (McKinney et al. 2011; Skovsgaard et al. 2010; Stener 2013).

Individualna otpornost jedinstvenih osobina običnog jasena je zapravo bila dokazana, međutim vrlo malo objava ima o istraživanjima individualne otpornosti poljskog jasena (*F. angustifolia*). Istraživanja na poljskom jasenu nisu potvrdila hipoteze koje su postavljene za obični jasen, te iako neki klonovi poljskog jasena pokazuju jasno pojačano ometanje rasta patogena, nije dokazana korelacija smanjenog djelovanja patogena i manje oštećenosti krošnje (Hauptman 2013; Hauptman et al. 2016). Također u istim istraživanjima nije potvrđeno da jaseni koji u proljeće prvi prolistavaju odnosno koji ranije odbacuju list u jesen, su otporniji na pojavu bolesti. To potvrđuje našu pretpostavku da bi poljski jasen mogao sasvim drukčije reagirati na patogena *H. fraxineus* nego što je to bio primjer kod običnog jasena. Koliku vrijednost imaju takvi nalazi i kakve su mogućnosti križanja i selekcije za otpornost, ovisi o tome kako se otpornost prenosi odnosno nasljeđuje s roditelja na potomstvo (Kjær et al. 2012). U nekim istraživanjima ocijenili su da nasljednost u širem smislu iznosi 0.25 – 0.54 (McKinney et al. 2011). U kasnijim pokusima na potomstvu u Danskoj je utvrđeno da velik dio predstavlja aditivna genetska varijanca, pa su nasljednost u užem smislu ocijenili na 0.37 – 0.52 (Kjær et al. 2012). Slične vrijednosti su istraživanjima dobili u Litvi (Pliūra et al. 2011) gdje su nasljednost u užem smislu ocijenili na 0.40 – 0.49.

## 1.2. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Prije početka istraživanja određeni su i usuglašeni ciljevi i hipoteze istraživanja koji su niže prikazani.

Ciljevi istraživanja:

C1: Utvrditi rasprostranjenost i štetnost gljive *H. fraxineus* na vrstama jasena *Fraxinus* spp. u Hrvatskoj

- C2: Utvrditi razlike u otpornosti i selekcija genetski osjetljivih klonova vrste *F. angustifolia* na djelovanje gljive *H. fraxineus*
- C3: Odrediti postoji li genetska i morfološka varijabilnost izolata gljive *H. fraxineus* iz Hrvatske i drugih populacija u Europi na primjeru belgijskih izolata
- C4: Utvrditi utječe li prisutnost mikovirusa na pad virulentnosti gljivičnog patogena *H. fraxineus*
- C5: Utvrditi postoje li razlike u kemijskom sastavu lišća neinficiranog domaćina i inficiranog domaćina gljivičnim patogenom *H. fraxineus*, te je li povezan s jačim ili slabijim djelovanjem patogena.
- C6: Utvrditi mogućnosti rasta micelija gljive *H. fraxineus* na različitim tipovima hranidbene podloge s ekstraktima lišća pojedinih vrsta jasena

#### Hipoteze istraživanja:

- H1: Gljiva *H. fraxineus* prisutna je u gorskim i nizinskim predjelima Hrvatske u području rasprostranjenja običnog i poljskog jasena, ali nije prisutna u termofilnim zajednicama crnog jasena. Izaziva sušenje i odumiranje gorskog i poljskog jasena u prirodnim sastojinama Hrvatske.
- H2: Postoji razlika u osjetljivosti klonova poljskog jasena na djelovanje gljivičnog patogena *H. fraxineus*.
- H3: DNA analize hrvatskih i belgijskih izolata gljive *H. fraxineus* pokazuju genetsku varijabilnost što dovodi do pretpostavke da varijabilnost ovisi o klimatskim i geografskim faktorima.
- H4: Mikovirusi unutar gljivičnih izolata *H. fraxineus* uzrokuju pad virulentnosti i smanjenu aktivnost patogena.
- H5: Kemijski sastav lišća domaćina inficiran gljivičnim patogenom *H. fraxineus* razlikuje se između inficiranih i neinficiranih biljaka, te je direktno povezan s jačim ili slabijim djelovanjem patogena.
- H6: Ekstrakti lišća pojedinih vrsta jasena (*Fraxinus* spp.) djeluju inhibitorno na rast gljivičnog patogena *H. fraxineus*

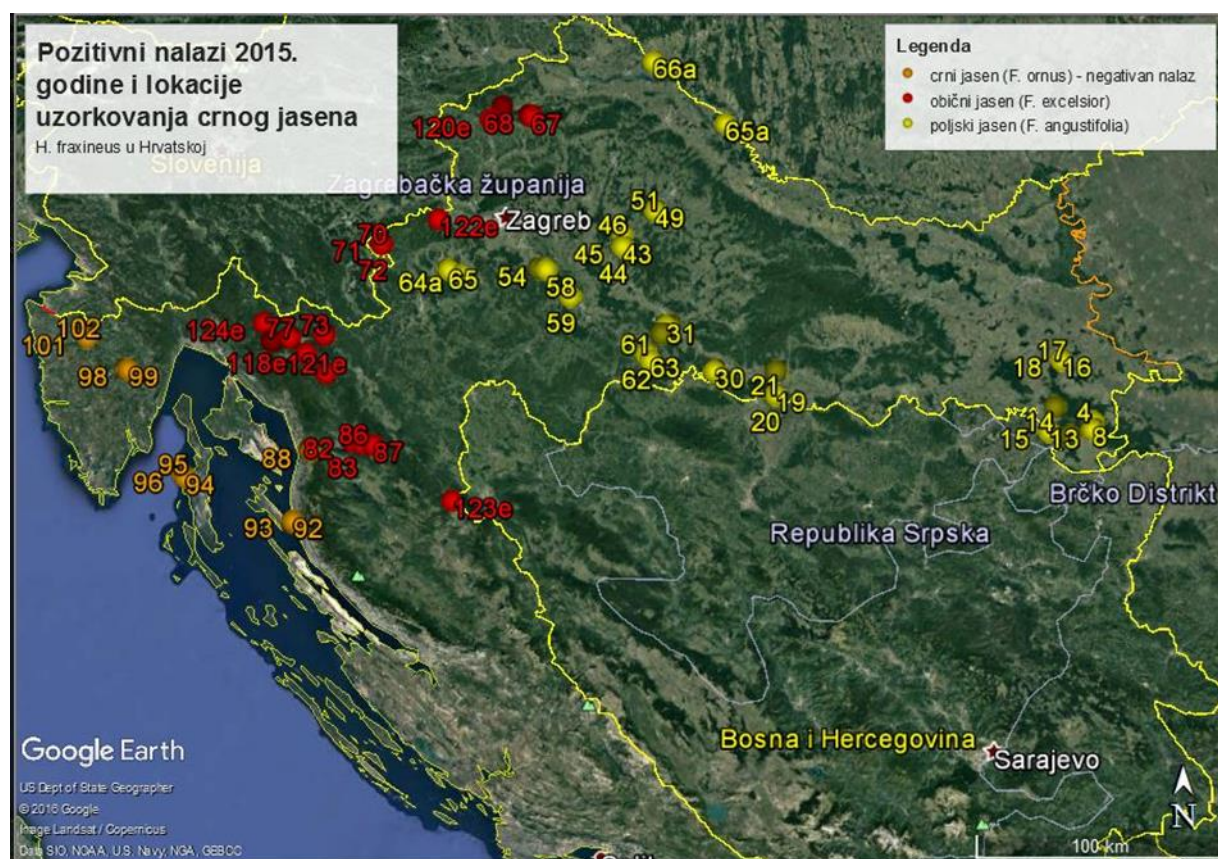


Tijekom istraživanja krucijalno je bilo otkriti rasprostranjenost patogena, njegove sposobnosti i mogućnosti širenja u okviru njegove biologije, procijeniti oštećenosti sastojina pod njegovim djelovanjem te utvrditi dali je sušenje izazvano patogenom *H. fraxineus* ili nekim drugim biotskim organizmom ili abiotskim faktorom. U sklopu istraživanja trebalo je odrediti mogućnosti i vremenski period najvećeg infekcijskog potencijala gljive u raznovrsnim i specifičnim klimatskim regijama Hrvatske. Iako je gljiva *H. fraxineus* primarni uzrok bolesti koja uzrokuje propadanje jasenovih sastojina u Europi, postoje i drugi organizmi koji intenziviraju napad, stoga je važno bilo odrediti druge vrste organizama koje se pojavljuju u tkivima zaraženog domaćina, te otkriti eventualne druge uzročnike koji su sastavni dio kompleksnog problema odumiranja jasena. Učinkoviti način zaustavljanja bolesti još nije poznat, međutim pojavom soliternih stabala koja uspješno godinama izbjegavaju pojavu infekcije i pripadajućih simptoma bolesti, zatim dugogodišnje odupiranje pojedinih stabala pod intenzivnom infekcijom u intenzivno inficiranim sastojinama s nebrojenim nekrozama da podlegnu djelovanju patogena, otvara mogućnosti otkrivanja uzroka tih nepogodnih pojava za razvoj patogena te iskorištavanja istih u svrhu prevencije i suzbijanja bolesti. Iz tog razloga pokrenuli smo pokuse istraživanja i klasificiranja klonova poljskog jasena prema fenološkim svojstvima listanja te ukupnom trajanju vegetacijske periode u svrhu određivanja klonova s kraćom vegetacijskom periodom bez fotosintetskih regenerativnih organa za vrijeme najvećeg infekcijskog potencijala gljive, te odbacivanjem istih u kraćem razdoblju, prije mogućnosti prodora patogena do ligninoznog tkiva, iskazujući na taj način pasivnu otpornost na patogena. Zatim pokrenuli smo testove određivanja osjetljivosti klonova poljskog jasena na napad gljivičnog patogena, s obzirom na genetska svojstva otpornosti pojedinih klonova odnosno tolerantnosti na patogen. Potrebno je bilo napraviti morfološku i fenotipsku tipizaciju izolata, identificirati patogena i njegove varijacije sojeva, zatim molekularno ekstrakcijom DNA potvrditi morfološke identifikacije vrste, te izvršiti genetsku analizu i usporedbu genetskih varijacija hrvatskih izolata s drugim izolatima iz Europe. Testirali smo Hrvatske i Belgijske izolate na prisutnost mitovirusa HfMV1, te testirali njegov biološki potencijal hipovirulencije na patogena *H. fraxineus*. Odradili smo testiranje idiomorfa seksualnih tipova odabranih izolata patogena. Razvili smo različite testove za određivanje morfoloških osobina rasta i fruktifikacije izolata patogena s obzirom na različite promijenjive varijable kao što su različite temperature, utjecaj domaćina pomoću ekstrakta lišća različitih vrsta jasena, djelovanja različitih spektara ultravioletne svjetlosti, te testiranja alternativnih sredstava za zaštitu bilja u svrhu boljeg shvaćanja biologije patogena, njegovih "osobina", te restriktivnih graničnih

vrijednosti i eventualne upotrebe istih u kontroli bolesti. Obavljena je i analiza nutritivnih vrijednosti odnosno elemenata ishrane lista zaraženih i nezaraženih klonova poljskog jasena u svrhu boljeg razumijevanja djelovanja patogena na metabolizam domaćina, te međusobne odnose patogen – domaćin prilikom infekcije i progresije bolesti. Tijekom istraživanja obavljen je niz umjetnih inokulacija i testovi patogenosti u kojima smo istraživali varijable, kao utjecaj temperature na rast patogena i tvorbu nekroza infekcijom hrvatskih izolata, utjecaj različitih domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza, testiranje osjetljivosti klonova iz klonskih sjemenskih plantaža, testiranje hipovirulentnosti, te injektiranje alternativnih sredstava zaštite u inficirane sadnice. Sve te varijable testirane su kao mogućnosti kontrole bolesti u kontroliranim laboratorijskim, ali i nekontroliranim prirodnim uvjetima, te kao varijable čiji rezultati istraživanja nam mogu dati naprocijenjive podatke za predikciju razvoja i širenje bolesti na terenu.

### 1.3. Područje istraživanja

Ukupna površina šuma i šumskih zemljišta u Republici Hrvatskoj iznosi 2 688 687 ha što je 47% kopnene površine države. Od toga je 2 106 917 ha u vlasništvu Republike Hrvatske, dok je 581 770 ha u vlasništvu privatnih šumoposjednika. Glavnom šuma u vlasništvu države gospodare Hrvatske šume d.o.o., odnosno površinom od 2 018 987 ha. Rod *Fraxinus* se sa svoje tri autohtone vrste (*F. angustifolia*, *F. excelsior* i *F. ornus*) rasprostire na većini tih površina, negdje samo kao pojedinačno soliterno stablo, negdje u većem omjeru smjese vrsta, dok u kontinentalnom nizinskom dijelu poljski jasen dolazi kao ravnopravna vrsta nizinskih šuma s hrastom lužnjakom koja s drvnom zalihom od 17 600 000 m<sup>3</sup> tvori izuzetno važnu vrstu u gospodarskom i ekonomskom smislu. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2013. – 2016. godine na području UŠP Vinkovci, UŠP Nova Gradiška, UŠP Bjelovar, UŠP Zagreb, UŠP Koprivnica, UŠP Karlovac, UŠP Sisak, UŠP Delnice, UŠP Gospić, UŠP Senj i UŠP Buzet. Istraživanje se provodilo u državnim šumama iz razloga jer su te sastojine gospodarski uređenije, većih prirodnih kompleksa, prate smjernice uzgajanja šuma, te nisu narušene dugogodišnjim lošim gospodarenjem i upravljanjem kao većina privatnih šuma u Republici Hrvatskoj. S obzirom na tako široku distribuciju uzorkovanja morali smo generalno podijeliti cijelo područje na tri glavna segmenta koje osim geografskih sličnosti prate i klimatske slične prilike, a i pripadajuća vrsta jasena.



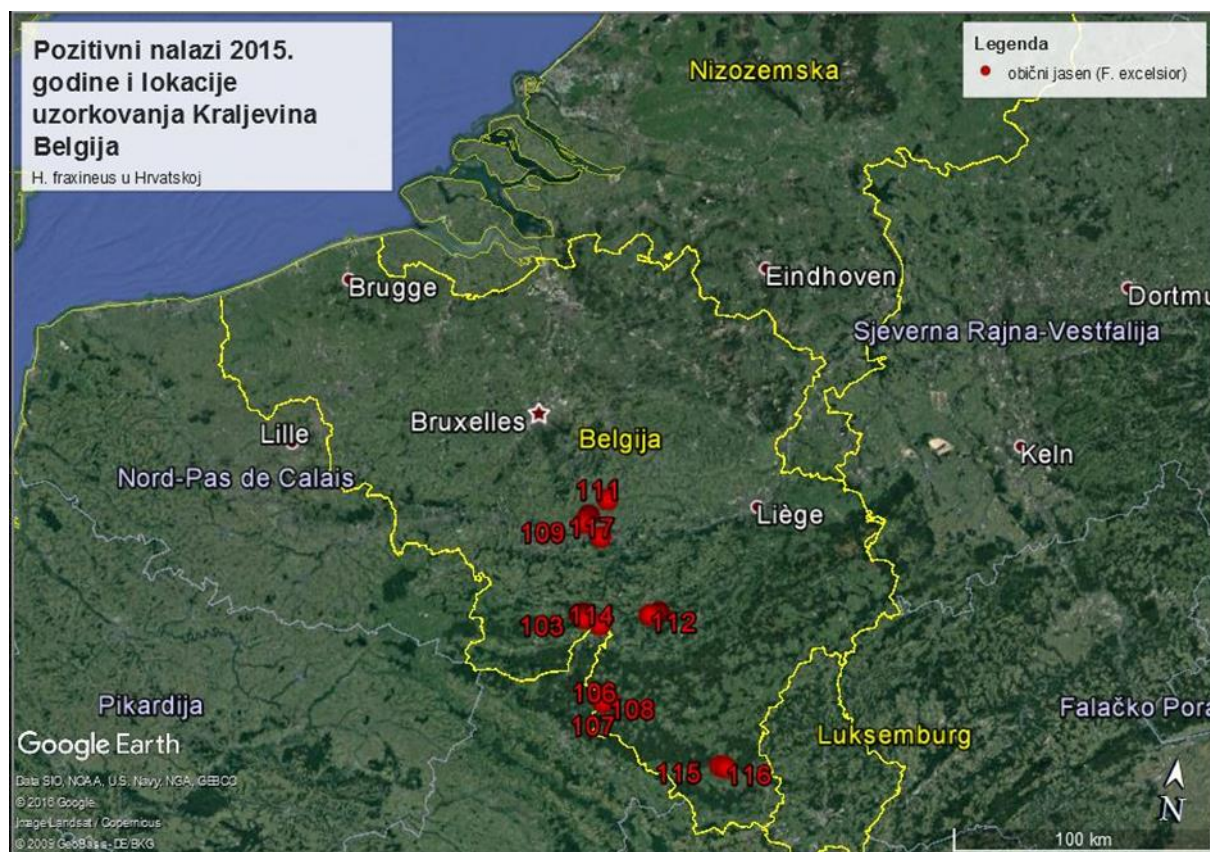
Slika 12. Ukupne lokacije pozitivnih uzorkovanja poljskog i običnog jasena, do 2016. godine u Republici Hrvatskoj i negativne lokacije uzorkovanja crnog jasena

Figure 12. Total positive locations sampling of narrow-leaved and common ash till 2016 in Republic of Croatia and negative sampling locations of manna ash

Prvi segment pripada mediteranskom području Hrvatske u kojem je istraživana i uzorkovana crni jasen i ti lokaliteti pripadaju UŠP Buzet i UŠP Senj. Drugi segment pripada gorskom području Hrvatske gdje je autohtona vrsta obični jasen, a teritorijalno se rasprostire na područje UŠP Delnice, UŠP Gospić, UŠP Karlovac i UŠP Koprivnica. Treći segment se odnosi na kontinentalno nizinsko područje Hrvatske gdje je autohtona vrsta poljski jasen i teritorijalno se točke uzorkovanja rasprostiru na područje UŠP Karlovac, UŠP Sisak, UŠP Zagreb, UŠP Bjelovar, UŠP Nova Gradiška i UŠP Vinkovci. Sva područja i lokacije uzorkovanja prikazana su (Slika 12).

Uzorci za dobivanje belgijskih izolata gljive *H. fraxineus* radi testova usporedbe hrvatskih i belgijskih izolata na molekularnoj razini sakupljeni su u južnom području Kraljevine Belgije (Slika 13).





Slika 13. Ukupne lokacije pozitivnih uzorkovanja običnog jasena za dobivanje izolata *H. fraxineus* u Kraljevini Belgiji 2015. godine

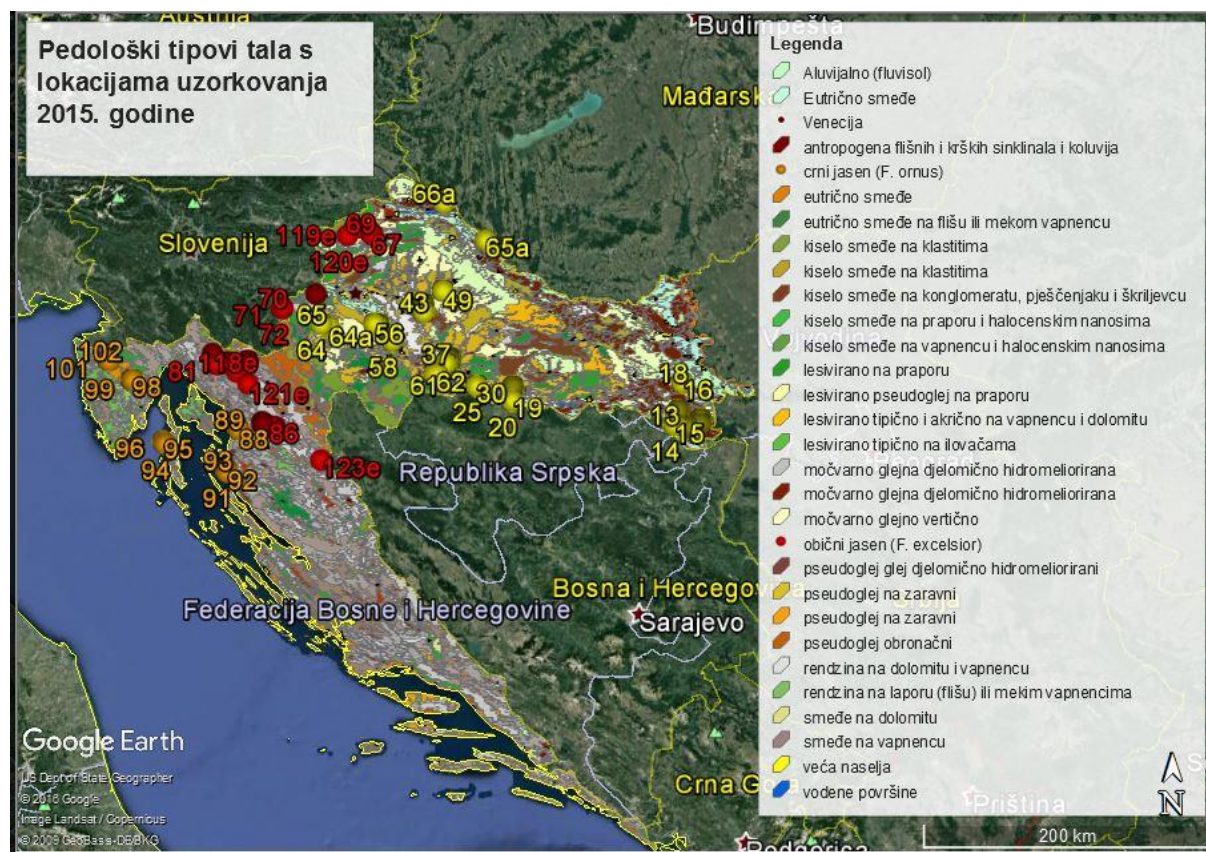
Figure 13. Total positive sampling locations of common ash for isolation *H. fraxineus* in Kingdom of Belgium 2015

U mediteranskom području Hrvatske, crni jasen se na lokacijama uzorkovanja, nalazio na nekoliko tipova tla: smeđe tlo na vapnencu, rendzina na trošini vapnenca, rendzina na dolomitu i vapnencu, rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima, te antropogena tla flišnih i krških sinklinala i koluvija (Slika 14). Na svim područjima uzorkovanja izolacije gljive *H. fraxineus* iz crnog jasena u prirodnim uvjetima nisu bile uspješne, čak ni u graničnim, rubnim, prijelaznim zonama ekoloških niša običnog i crnog jasena.

U gorskom području Hrvatske, obični jasen se na lokacijama uzorkovanja nalazi na sljedećim tipovima tla: rendzina na dolomitu i vapnencu, rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima, kiselo smeđe tlo na klastitima, smeđe tlo na dolomitu, smeđe tlo na vapnencu, te močvarno glejna tla djelomično hidromeliorirana.

U nizinskom području Hrvatske, poljski jasen se na lokacijama uzorkovanja nalazi na sljedećim tipovima tla: ritska crnica djelomično hidromeliorirana, močvarno glejna tla djelomično hidromeliorirana, aluvijalno tlo (fluvisol) obranjeno od poplava, eutrično smeđe

tlo, močvarno glejno vertično tlo, pseudoglej – glej djelomično hidromeliorirani, te pseudoglej na zaravni.



Slika 14. Pedološka karta tipova tla na lokacijama uzorkovanja jasena *Fraxinus* spp. u Hrvatskoj

Figure 14. Pedological map of soil type on the sampling ash locations *Fraxinus* spp. in Croatia

Klima je na tom širokom području kao i geografski položaj i reljef i ostale značajke područja vrlo raznolika. Objedinjavanje klimatskih podataka, pogotovo za dulje vremensko razdoblje, problematično je iz razloga što samo su određena područja s trajnim meteorološkim postajama koje prate dugogodišnje vremensko razdoblje, a još je i manje postaja koje imaju neprekinuti niz praćenja. Tek se u natrag nekoliko godina povećao broj pokretnih meteoroloških postaja za točnije i preciznije podatke u područjima izvan većih urbanih zona, kao što su šumska područja i ruralna naselja.

Za opisivanje klime na cijelom području uzorkovanja odabrane su reprezentativne lokacije klimatoloških i glavnih hidrometeoroloških postaja, te s podacima trajnih mjerenja izrađeno je devet klimadijagrama (po tri za svako geografsko - klimatsko područje). Period mjerenja klimatoloških podataka za izradu klimadijagrama uzet je od 1985. – 2015. godine. Nizinska

Hrvatska opisana je klimatološkim podacima postaje Čazma, Nova Gradiška – Cernik i Gradište. Gorska Hrvatska i Lika opisane su postajama Delnice, Brinje i Bosiljevo, a mediteransko područje opisano je postajama Pazin, Cres i Senj.

Klima mediteranskog područja Hrvatske gdje su sakupljani uzorci crnog jasena opisana je od sjevera prema jugu trima klimatološkim postajama (Slika 15).

Klima područje Pazina prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima vrlo vlažna s toplim ljetom (oznaka Cfb). Padaline su jednoliko raspoređene tijekom cijele godine s pojačanim razdobljem u jesen. Prosječna godišnja temperatura zraka je 11.7 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 1042 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od ožujka do kraja studenog. Prema Langu klima je semihumidna s faktorom (LKf) 88.76.

Klima područje Cresa prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima s suhim vrućim ljetom (oznaka Csa). Padaline su pojačane u jesenskom, a reducirane u ljetnom periodu. Prosječna godišnja temperatura zraka je 14.9 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 1089 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje tijekom cijele godine. Prema Langu klima je semihumidna s faktorom (LKf) 73.04.

Klima područje Senja prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima s suhim vrućim ljetom (oznaka Csa). Padaline su pojačane u jesenskom, a reducirane u ljetnom periodu. Prosječna godišnja temperatura zraka je 15.3 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 1221 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje tijekom cijele godine. Prema Langu klima je semihumidna s faktorom (LKf) 79.7.

Klima gorskog i ličkog područja Hrvatske gdje su sakupljani uzorci običnog jasena opisana je od istoka prema zapadu trima klimatološkim postajama (Slika 16).

Klima područje Delnica prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima s suhim toplim ljetom (oznaka Csb). Padaline su najviše u jesenskom periodu a najmanje u ljetnom periodu. Prosječna godišnja temperatura zraka je 8.8 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 2157 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od travnja do kraja listopada. Prema Langu klima je perhumidna s faktorom (LKf) 244.03.

Klima područje Brinja prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima s suhim toplim ljetom (oznaka Csb). Padaline su najviše u jesenskom periodu a najmanje u



ljetnom periodu. Prosječna godišnja temperatura zraka je 9.7 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 1288 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od travnja do kraja listopada. Prema Langu klima je humidna s faktorom (LKf) 132.75.

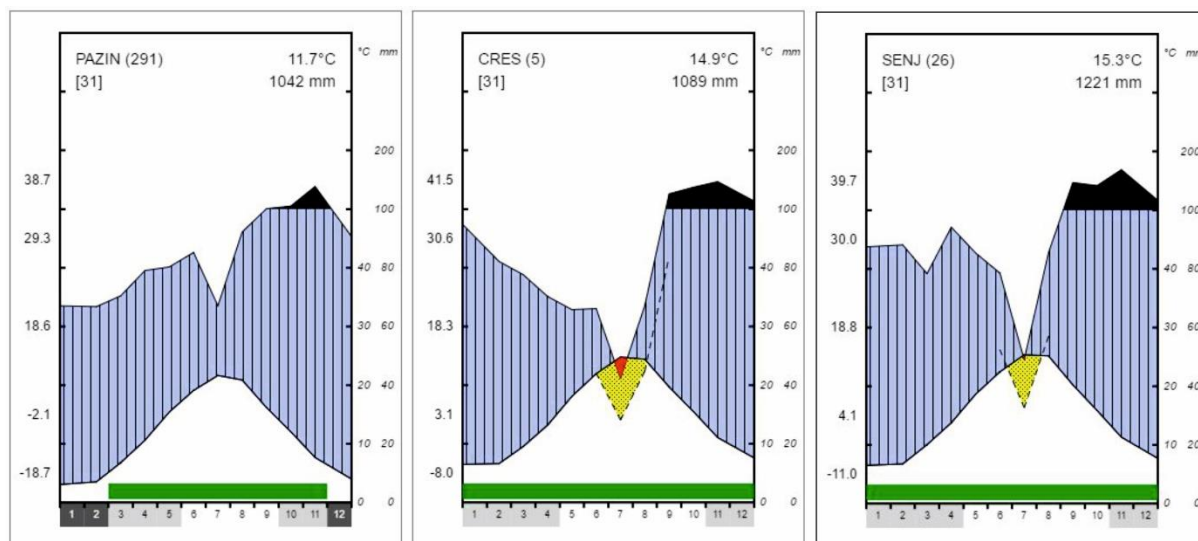
Klima područje Bosiljeva prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima vrlo vlažna s toplim ljetom (oznaka Cfb). Padaline su jednoliko raspoređene tijekom cijele godine s pojačanim razdobljem u jesen. Prosječna godišnja temperatura zraka je 10.6 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 1269 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od ožujka do kraja listopada. Prema Langu klima je humidna s faktorom (LKf) 119.86.

Klima nizinskog područja Hrvatske gdje su sakupljani uzorci poljskog jasena opisana je od zapada prema istoku trima klimatološkim postajama (Slika 17).

Klima područje Čazme prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima vrlo vlažna s toplim ljetom (oznaka Cfb). Padaline su jednoliko raspoređene tijekom cijele godine s najsušim razdobljem tijekom zimskih mjeseci. Prosječna godišnja temperatura zraka je 11.4 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 856 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od ožujka do kraja studenog. Prema Langu klima je semihumidna s faktorom (LKf) 74.81.

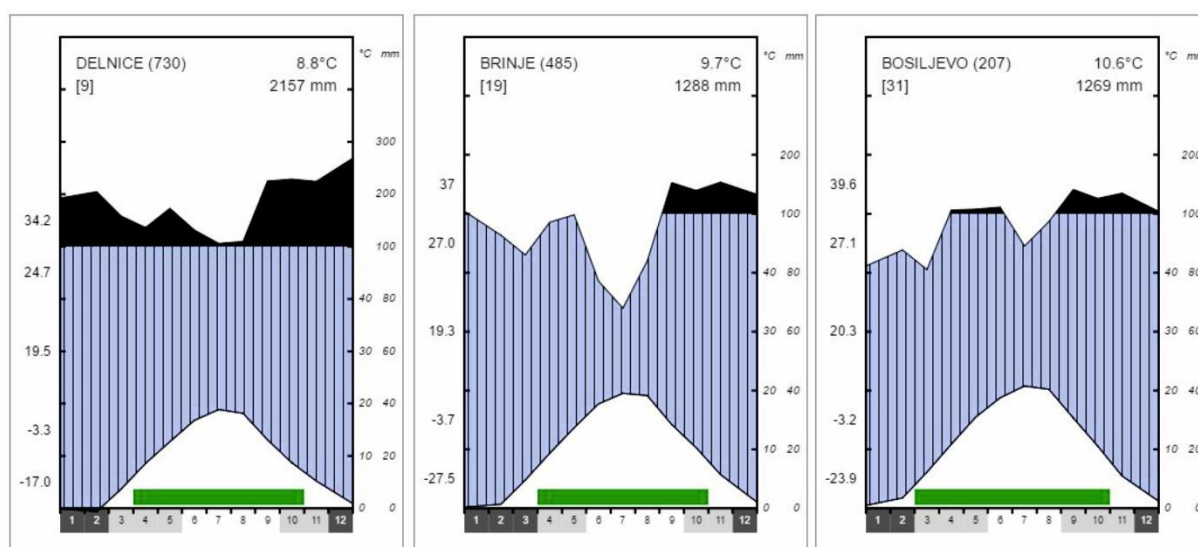
Klima područje Nove Gradiške - Cernik prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima vrlo vlažna s toplim ljetom (oznaka Cfb). Padaline su jednoliko raspoređene tijekom cijele godine s najsušim razdobljem tijekom zimskih mjeseci. Prosječna godišnja temperatura zraka je 11.2 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 800 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od ožujka do kraja studenog. Prema Langu klima je semihumidna s faktorom (LKf) 71.71.

Klima područje Gradišta prema Köppenovoj klasifikaciji određena je kao topla umjerena klima s vrućim ljetom (oznaka Cfa) s ponegdje izraženim sušnim razdobljem tijekom ljetnih mjeseci. Padaline su jednoliko raspoređene tijekom cijele godine s najsušim razdobljem tijekom zimskih mjeseci. Prosječna godišnja temperatura zraka je 11.8 °C. Prosječna godišnja količina oborina je 683 mm. Vegetacijsko razdoblje (prosječna temperatura zraka >6 °C) traje od ožujka do kraja studenog. Prema Langu klima je semiaridna s faktorom (LKf) 57.73.



Slika 15. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Pazin, Cres i Senj za razdoblje 1985. – 2015. godine

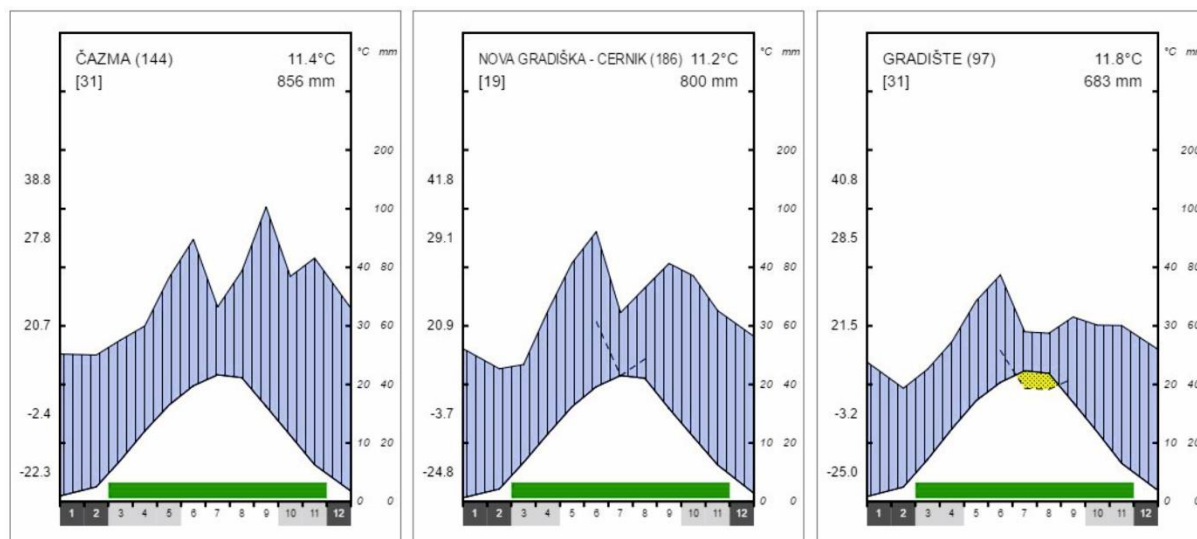
Figure 15. Climadiagrams based on the wheather stations data for Pazin, Cres and Senj for the period 1985 – 2015



Slika 16. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Delnice, Brinje i Bosiljevo za razdoblje: Delnice (2007. – 2015. godine), Brinje (1997. – 2015. godine) i Bosiljevo (1985. – 2015. godine)

Figure 16. Climadiagrams based on the wheather stations data for Delnice, Brinje and Bosiljevo for the period: Delnice (2007 – 2015), Brinje (1997 – 2015) i Bosiljevo (1985 – 2015)





Slika 17. Klimadijagrami prema podacima meteoroloških postaja Čazma, Nova Gradiška – Cernik i Gradište za razdoblje: Čazma i Gradište (1985. – 2015. godine), Nova Gradiška - Cernik (1997. – 2015. godine)

Figure 17. Climadiagrams based on the weather stations data for Čazma, Nova Gradiška – Cernik and Gradište for the period: Čazma and Gradište (1985 – 2015), Nova Gradiška - Cernik (1997 – 2015)

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

#### 2.1.1. Istraživanja prisutnosti patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

##### 2.1.1.1. Planiranje pokusa i izbor lokacija za postavljanje istraživačkih ploha

Za ostvarenje ciljeva istraživanja postavljene su istraživačke plohe u sastojinama poljskog i običnog jasena kako bi se obuhvatila sva staništa s alarmantnom problematikom odumiranja autohtonih vrsta jasena u Hrvatskoj. Sakupljane su informacije dobivene s terena od strane revirnika, o poznatim lokalitetima registriranih problema sušenja iz Uprava šuma raznih podružnica. Analizom programa gospodarenja za prijavljene gospodarske jedinice odabrani su reprezentativni odjeli i odsjeci s problemima sušenja i problemima gospodarenja koji su prijavljeni s vrstama roda *Fraxinus*. Odabrani su i lokaliteti uzimanja uzoraka crnog jasena zbog eventualne mogućnosti konfirmacije latentnog patogena iako nema zabilježenih podataka o problematici sušenja crnog jasena. Nakon toga na terenu pregledom pojedinih dionica odjela i detaljnim pregledom odsjeka utvrđene su reprezentativne lokacije različitih uvjeta s različitim intenzitetima sušenja kao referencijalne točke za sakupljanje uzoraka. Uzorkovanje je obavljeno na području UŠP Vinkovci, UŠP Nova Gradiška, UŠP Bjelovar, UŠP Zagreb, UŠP Koprivnica, UŠP Karlovac, UŠP Sisak, UŠP Delnice, UŠP Gospić, UŠP Senj i UŠP Buzet.

Plohe se nalaze na različitim tlima i u području različitih klimazonalnih zajednica, na različitim nagibima, ekspozicijama, nadmorskim visinama i matičnim podlogama. Područja istraživanja protežu se kroz 11 podružnica Uprava šuma od krajnjeg istoka do krajnjeg zapada Republike Hrvatske. Prikupljanje uzoraka na terenu provedeno je tijekom 2013., 2014. i 2015. godine. Raspored lokacija uzorkovanja prikazan je na (Slika 12), te pripadajući podaci o svakoj pojedinoj lokaciji prikazani su (u prilogu Tablica 40; Tablica 41). Za potrebe pokusa usporedbe izolata patogena *Hymenoscyphus fraxineus* na molekularnoj razini između hrvatskih i belgijskih izolata, dogovoren je unaprijed identični protokol odabira stabala i izolacije patogena za belgijske izolate. Podaci lokacija uzorkovanja belgijskih izolata prikazani su (u prilogu Tablica 41) i na (Slika 13).

##### 2.1.1.2. Postavljanje istraživačkih ploha

Pregledom sastojina, nakon prethodnih odabira najugroženijih odjela, odabrane su unutar svakog odjela tri reprezentativne krucijalne točke koje predstavljaju reprezentativnu sliku te

sastojine, ne samo uključujući strukturni udio vrsta i dobi već i simptomatsku sliku problematike sušenja. Oko reprezentativne točke u krugu od 25 m uzimani su uzorci drvnih tkiva za fitopatološku analizu. U svakom reprezentativnom krugu s lokacijskom točkom uzorkovano je najmanje tri stabla za dobivanje reprezentativnog uzorka u pokušaju identifikacije uzročnika sušenja. Primjerni reprezentativni krugovi od 25 m polumjera predstavljali su površinu mjesta detaljnog pregleda i uzorkovanja od 1962.5 m<sup>2</sup>, s ukupno tri takve površine u svakom odjelu ukupna uzorkovana površina iznosila je 5887.5 m<sup>2</sup>.

### 2.1.1.3. Sakupljanje, obrada i analiza drvnog tkiva

#### Sakupljanje uzoraka drvnog tkiva na terenu

Uzorci drvnog tkiva sakupljeni su s pojedinih stabala na slijedeći način. Obaranjem odabranog reprezentativnog stabla s vidljivim simptomima sušenja stablo je podijeljeno na 3 glavna dijela, bazu stabla odnosno sami prerez debla pri obaranju na granici s vratom korijena, deblo odnosno središnji dio stabla do prvih grana, te krošnju koja je sačinjavala sve od prve grane na deblu do vršnog izbojka (Slika 18). Prije svakog uzimanja uzorka svaki je segment detaljno pregledan i poslikan. Detaljnim pregledom segmenta odredili su se vanjski kriteriji točnog prereza prema manifestiranju određenih simptoma bolesti.

Uzorci su uzimani redom kako slijedi, iz baze poprečni presjek baze debla odnosno kolut drvnog tkiva, ukoliko su na poprečnom prerezu bile vidljive diskoloracije izvršeno je još nekoliko prereza prema središnjem deblu da se vidi do koje visine i udaljenosti diskoloracije sežu, prema potrebi uzimao se poprečni prerez i iz viših kolutova. Nakon uzorkovanja baze rezalo se deblo na 2 m dužine (zbog iskorištavanja tehničkog drva), ukoliko se na prerezu pokazala diskoloracija ili naznake na mogućnost pojave diskoloracije tada se trupac rezao na manje segmente, te se uzimao uzorak poprečnog koluta debljine 1 - 2 cm. Ukoliko na deblu nije bilo vidljivo simptoma diskoloracija tada se uzimao kolut na svaka 2 m zbog eventualne prisutnosti patogena u nediskoloriranim simptomatski zdravim dijelovima drvnog tkiva. Nakon uzorkovanja baze i debla uslijedilo je uzorkovanje krošnje.

Krošnja je ponajprije detaljno pregledana, kao i svaki prethodni segment, a potom se seciralo sve grane i grančice od tanjih prema debljim segmentima. Zbog tipa progresije bolesti od tanjih prema debljim dijelovima lakše je na taj način bilo pratiti napredovanje bolesti, te doći do prijelaza iz mrtvog u živo drveno tkivo koje nam je potrebno za izolacije patogena. Uzimani

su uzorci grančica i vršnih izbojaka prema procjeni lokacije najveće aktivnosti patogena radi lakšeg i sigurnijeg dobivanja kultura gljivičnog patogena. Također su uzimani i kolotovi debljih grana na rubovima diskoloracija odnosno dijelovima vidljive progresije gljive. Uzimani su i uzorci mrtvog tkiva radi identifikacije vrsta gljiva koje dolaze nakon odumiranja pojedinih drvnih segmenata usljed djelovanja primarnog patogena, ali i uzorci živog potpuno vizualnog zdravog tkiva radi utvrđivanja statusa tog tkiva kao doista zdravog bez prisutnosti patogena ili možda ipak već inficiranog primarnim patogenom bez vizualnih simptoma.



Slika 18. Shema uzorkovanja drvnog tkiva stabala u tri glavne sekcije

Figure 18. Scheme of sampling wood tissue in three main sections

### Prijenos i pohrana uzoraka za laboratorijsku obradu

Svi uzorci sakupljeni na terenu označavali su se brojem uzorka, lokacijom, datumom uzorkovanja i vrstom drveća na kojoj je uzorak uzet. Svaki je uzorak pažljivo pohranjen u zasebne vrećice da se izbjegne mogućnost miješanja uzoraka ili *cross* – kontaminacije. Uzorci

su prenešeni u laboratorij za patologiju drveća Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Posebna pažnja posvećena je da prilikom prijenosa uzoraka temperature u kojima se uzorci nalaze budu niske i da ne prelaze 35 °C, u tom slučaju za prijenos se upotrebljavalo prijenosne terenske torbe s toplinskom izolacijom. Uzorci nisu biti izloženi povišenim temperaturama kroz duži vremenski period (3h i više). Svi svježi uzroci obrađeni su unutar 48 h od trenutka uzimanja uzoraka na terenu. Ukoliko izvanredno nije postojala mogućnost ekspeditivne laboratorijske obrade, uzorci su pohranjeni u posebnim plastičnim vrećicama do 7 dana na temperaturi od +4 °C ili dubokim zamrzavanjem na -20 °C na dulji vremenski period (30 dana).

### **Analiza svježih uzoraka drvnog tkiva u laboratoriju**

U laboratoriju su uzorci najprije razvrstani prema pripadajućem dijelu stabla, zatim prema veličini, dijelu drvnog tkiva, prisutnosti ili neprisutnosti simptoma bolesti, pojavnosti diskoloracija, nekroza, suhim mrtvim ili živim dijelovima tkiva, te segmentima s područjima prelaska iz mrtvog u živi dio tkiva. Budući da su dijelovi drvnog tkiva s rubnim graničnim mjestima prelaska iz mrtvog ili diskoloriranog tkiva u živi zdravi dio tkiva područja najveće aktivnosti gljivičnih patogena, ta su mjesta posebno selektirana i u najvećoj mjeri upotrebljavana za izolacije patogena.

Nakon razvrstavanja i selekcije uzoraka uzorci su dalje obrađeni na način da se na svakom uzorku odabrao segment koji je najprikladniji za daljnje postupke izolacije, taj se proces vršio uz pomoć svjetlosnog stereomikroskopa (Motic SMZ - 168 TLED). Određeni segment za odabranu obradu se izdvojao iz uzorka, površinski se sterilizirao potapanjem u otopinu 0.4 % natrij hipoklorita (NaOCl) (0.4 % aktivnog klora) u vremenu od 2 min za uzorke s korom (izbojke, grane, grančice), te u vremenu od 1 min za uzorke drvnog tkiva bez kore. Nakon toga svi uzorci su dobro isprani u većoj količini ultra čiste destilirane vode (elektrovodljivost 0.055 µS/cm), osušeni upijajućim papirnatim ručnicima, te stavljeni 10 min na površinsku sterilizaciju pod djelovanje UVC antimikrobnog ultravioletnog svjetla u besprašnu komoru (laminarij) (SMBC 122 Iskra Pio d.o.o.).

Zatim je slijedio detaljan pregled uzorka i seciranje sa sterilnim skalpelima i ostalim laboratorijskim pomagalima i materijalom (pincete, pribor za sterilizaciju), pri čemu su se određene pomno odabrane sekcije drvnog tkiva stavljale na prethodno pripremljenu

hranidbenu podlogu za rast i razvoj micelija gljiva. Svi uzorci obrađivani su u skladu s EPPO PM 7/117(1) protokolom za dijagnozu (EPPO 2013).

### 2.1.2. Osutost stabala

Na svim lokalitetima sakupljanja uzoraka za fitopatološku analizu, prema metodologiji ICP Forests obavljena je procjena oštećenosti stabala putem vizualne procjene osutosti krošnja uzorkovanih stabala radi karakterizacije vitaliteta pripadajućih sastojina.

Osutost stabala procijenjena je na točnost od 5%, te su kasnije stabla razvrstana u stupnjeve osutosti (Tablica 2; Tablica 20). Procjena osutosti stabala rađena je u skladu s Priručnikom ICP Forests (Ferretti et al. 2016, Eichhorn et al. 2016), te Pravilnikom o načinu motrenja oštećenosti šumskih ekosustava Narodne novine NN 76/2013.

U svakoj je sastojini procijenjen postotak osutosti krošnja tri centralna uzorkovana stabla udaljena jedno od drugog 50 m, te šest pripadajućih okolnih stabala, te je tako u svakoj sastojini ukupno procijenjena osutost krošnja 21 stabla (Slika 19). Procjena osutosti stabala provodila se za navedene odabrane lokacije u lipnju, srpnju i rujnu 2016. godine. Ukupno je odabrano 14 lokacija i procijenjena je osutost krošnja na 294 pojedinačna stabla (Tablica 42; Tablica 43; Tablica 44; Tablica 45; Tablica 46).

Tablica 2. Stupnjevi osutosti krošnja prema ICP Forests metodi (Potočić et al. 2016)

Table 2. Defoliation classes according to ICP Forests method (Potočić et al. 2016)

STUPNJEVI OSUTOSTI	TIP OSUTOSTI	GUBITAK LISNE MASE (%)
0	NEMA	0 - 10
1	BLAGA	11 - 25
2	UMJERENA	26 - 60
3	JAKA	61 – 99
4	MRTVO STABLO	100





Slika 19. Primjeri četiri različita tipa osutosti krošanja jasena (Waser et al. 2014)

Figure 19. Examples of four different types of ash canopy damage (Waser et al. 2014)

### 2.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena

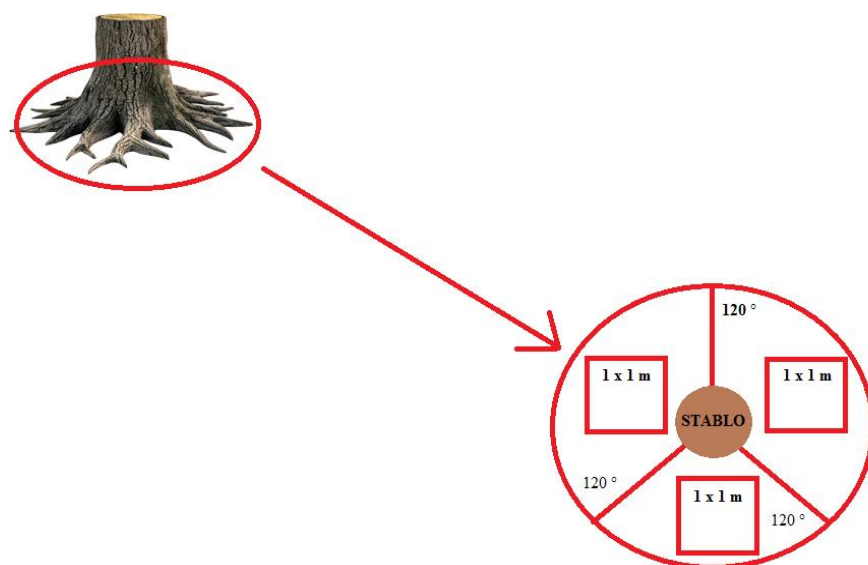
Zbog mogućnosti korelacije oštećenosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena baziranom na fruktifikaciji gljive (produkciji apotecija) razvijena je metoda praćenja

pojavnosti i razvitka plodnih tijela (apotecija) patogene gljive *H. fraxineus*. Apoteciji se razvijaju na otpalim lisnim peteljka (rahisima) sastavljenog lista jasena. Odabrane su lokacije s problematikom sušenja i odumiranja jasena (visoke osutosti, smanjenog vitaliteta i povećanog mortaliteta) na kojima su uzeti uzorci i potvrđena prisutnost patogene gljive *H. fraxineus* (u prilogu Tablica 42; Tablica 43; Tablica 44; Tablica 45; Tablica 46).

Na svakoj lokaciji odabrana su tri centralna stabla s pripadajućim koordinatama međusobne udaljenosti 50 m, te je izvršena procjena osutosti krošnje centralnog i pripadajućih okolnih stabala (metoda opisana u poglavlju 2.1.2.). Podaci osutosti svih procijenjenih stabala na istoj lokaciji korišteni su kasnije za određivanja statističke korelacije s brojem produciranih apotecija gljive. Ispod centralnog stabla postavljena je nasumična ploha površine 1 m<sup>2</sup> na tlo ispod krošnje pojedinog odabranog stabla, te je unutar plohe u zvijezdastom uzorku sakupljano 50 rahisa. Na stablu je označena centralna linija postavljene plohe. Plohe su postavljane u tri različita razdoblja za vrijeme produkcije apotecija, sredinom lipnja, sredinom srpnja, te sredinom rujna. Plohe su se pomicale u odnosu na prvu plohu pod kutom od 120 ° u smjeru kazaljke na satu te rotirale oko debla odabranog stabla. Ukupno su postavljene tri plohe u tri različita vremenska razdoblja pod istom krošnjom u pravilnim prostornim razmacima (Slika 20).

U laboratoriju svaki je pojedini rahis posebno pregledavan, te su prebrojavani apoteciji gljive *H. fraxineus* na svakom rahisu te ukupan zbroj svih apotecija na 50 rahisa prema pripadajućem stablu. Za prebrojavanje apotecija kao pomagalo korišten je svjetlosni stereomikroskop (Motic SMZ - 168 TLED).





Slika 20. Shema metode sakupljanja lisnih rahisa s apotecijima gljiva *H. fraxineus*

Figure 20. Scheme of the method used for collecting leaf petioles with *H. fraxineus* apothecia

## 2.2. Istraživanja izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

### 2.2.1. Dobivanje čistih kultura gljiva

Hranidbene podloge za uzgoj gljivičnih vrsta rađene su prema uputstvima proizvođača, za izolaciju, uzgoj i dobivanje čistih kultura gljiva korišten je malt extract agar (MEA Oxoid™ CM0059) u 90 mm sterilnim plastičnim petrijevim zdjelicama. Za sterilizaciju 2 % MEA mediuma prije izlivanja u plastične petrijevke korišten je autoklav Kambič A-21 i KSG mini 12. U 2 % agar medium dodaje se 100 mg/L (otopina 1.0 µg/mL) streptomycin sulfat antibiotika prije izlivanja agara u petrijevke zbog spriječavanja pojave bakterija na hranidbenoj podlozi. Antibiotik se dodavao netom prije samog izlivanja agara kada je temperatura agara ohlađena na oko 45 °C (izmjereno beskontaktnim IR-termometrom ScanTemp 485, Dostmann electronic GmbH). Zbog termolabilnosti antibiotika koji bi na višim temperaturama postao inaktivan, minimalne temperature za dodavanje antibiotika su 55 – 60 °C. A cijeli proces manipulacije agarom, od pripreme petrijevki, kao i presađnja čistih kultura odvijala se u zaštićenom prostoru besprašne komore. Za pripremu 2 % agar mediuma, otapanje MEA (Oxoid™ CM0059) praška, kao i za otapanje streptomycin sulfat praška upotrebljavana je ultra čista destilirana voda (elektrovodljivost 0.055 µS/cm).

Nakon procesa izolacije gljiva iz drvnih tkiva na agar mediumu pojavljuju se i razvijaju različite vrste (sojevi) gljiva. Prije svega izuzetno je važno detektirati različite sojeve te ih

zasebno presaditi, sekcioniranjem dijela micelija s mikrobiološkom iglom (ezom) 0.5 x 0.5 x 0.5 cm te postavljanjem istog u novu petrijevu zdjelicu s čistom hranidbenom podlogom. Svi upotrebljavani instrumenti za presađnju čistih kultura (mikrobiološka igla, skalpel) moraju biti prije upotrebe sterilizirani (96 % etilnim alkoholom i plamenom).

Proraštanjem nove čiste kulture u novoj petrijevcu dobivamo mogućnost daljnje manipulacije u vidu identifikacije gljive. Za postupno izrastanje i tvorbu dostatne količine micelija za identifikaciju u prosjeku je potrebno od 2 – 4 tjedna u povoljnim uvjetima (optimalne temperature) za rast i razvoj gljiva. Rast i razvoj gljiva zahtjeva specijalne optimalne uvjete za svaku vrstu posebno koje nam omogućuju specijalne klima-komore korištene u ovom israživanju (RK-500 CH Kambič d.o.o., Termo Medicinski Aparati BTES Frigomat i BTES-e Frigomat).

### **2.2.2. Identifikacija *Hymenoscyphus fraxineus* i ostalih izoliranih gljiva**

Svaka se petrijevka pregledavala nekoliko puta tjedno dok se nije postignuo željeni rast i razvoj micelija i pripadajućih fruktifikacijskih organa, odnosno sporulacija gljive. Na temelju morfoloških karakteristika boje, oblika micelija, septiranosti ili neseptiranosti hifa, oblicima i dimenzijama fruktifikacijskih organa te samih spora determinirala se vrsta gljive ili rod ukoliko je bilo nemoguće odrediti vrstu. Nakon određivanja vrste, gljive se klasificirala prema dostupnim spoznajama i literaturi o određenim determiniranim vrstama u saprotrofne ili parazitske skupine ili možda i neke od međuskupina s obzirom da je za neke vrste poznato da mogu spadati u skupinu fakultativnih parazita ili fakultativnih saprofita ili čak endofita. Učestalost pojavnosti određene vrste i zahtjevi biologije same vrste (određeni domaćin, određeni uvjeti rasprostranjenja, uvjeti fruktifikacije, uvjeti aktivnosti, uvjeti dormancije, itd.) nam govore o karakteristikama i specifičnosti pojedine vrste i njenom djelovanju na samog domaćina. Teorijska i laboratorijska saznanja primjenjivala su se dalje u terenskom testiranju testovima patogenosti gljivične vrste *H. fraxineus* na domaćina, koji su nam ukazivali iskazuje li spomenuta vrsta gljive sukladno očekivanju ili ne karakteristike patogena i ako da u kojoj mjeri, te može li se domaćin othrvati tom parazitskom djelovanju patogena.

### **2.2.3. Morfološka tipizacija izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (fenotipizacija izolata)**

Morfološka tipizacija izolata je izrazito važna zbog toga jer promatranjem različitih morfoloških osobina pojedine se osobine mogu ponekad povezati s ispoljavanjem određenih svojstava gljive. Svojstva gljive vezana su za biologiju same vrste, kao što je pojačana ili smanjena fruktifikacija određenih izolata, zatim odlike rasta koje mogu biti povezane s

određenim temperaturama (što je vezano za sposobnost preživljavanja određenog izolata pri ekstremnim uvjetima), promjena boje izolata prilikom djelovanja unutarnjih ili vanjskih promjena (pojava hiper ili hipovirulentnosti izolata) i slično. Odlike morfološke tipizacije mogu se manifestirati i zbog prilagodbe različitim domaćinima na kojima se pojavljuju određeni tipovi izolata, te se isti sojevi ponekad razlikuju ako su izolirani s različitim domaćina (zbog sposobnosti prilagodbe gljive). Izolati se mogu i genetski razlikovati međusobno te ispoljavati određeno morfološko vizualno svojstvo razlike zbog toga. Međutim, najčešće i najlakše se prati utvrđivanje morfoloških značajki kulture kada genetski identične jedinice iz istih kultura izložene različitim vanjskim utjecajima iskazuju različite morfološke značajke ili obrnuto, kada genetski različite jedinice (kulture) istog soja izlažemo istim vanjskim utjecajima pod kojim one iskazuju različite morfološke značajke.

Sukladno tome u istraživanju su razvijene za gljivu *H. fraxineus* kategorije morfoloških odlika koje se moglo pratiti kroz određeni period vremena u kontroliranim identičnim uvjetima za sve izolate. Prema izgledu micelija u kulturi promatrali smo značajke odnosno obilježja kulture nakon 14 dana rasta. Glavna obilježja kulture bila su boja micelija (bijela, narančasta, bijela s narančastim segmentima, žuta), oblik micelija (okrugli, ovalni, nepravilan), oblik ruba micelija (puni, isprekidani), formiranje fialida (pojavnost, nepojavnost), produkcija sekundarnih metabolita (viridin) (pojavnost, nepojavnost). Ta su svojstva razvrstana u nekoliko potkategorija te su im dodijeljene binarne vrijednosti (0) i (1) ukoliko je svojstvo bilo odsutno ili prisutno. Popis odabranih promatranih izolata prikazan je (Tablica 3), a to su identični izolati koji su se koristili i u testovima genetske varijabilnosti izolata. Svaka odlika zasebno praćena je na kraju ili u određenom vremenskom intervalu, tako da za svaku odliku su vrijedili isti uvjeti.

Tablica 3. Popis odabranih izolata za morfološku i molekularnu tipizaciju

Table 3. List of selected isolates for morphological i molecular typization

POPIS HRVATSKIH IZOLATA						POPIS BELGIJSKIH IZOLATA					
Identifikacijski broj izolata	IZOLAT / LOKACIJA	Identifikacijski broj lokacije	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	Identifikacijski broj izolata	IZOLAT / LOKACIJA	Identifikacijski broj lokacije	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina
1	Lipovljani 199G	1	45.425043	16.822056	115	19	Soulmes 1I	7	50.181176	4.737623	152
2	Nova Gradiška K1		45.252200	17.361963	112	20	Soulmes 2I		50.194740	4.713733	200
3	Jasenovac 42C		45.255115	17.051017	88	21	Soulmes 1II		50.199408	4.742941	202
4	Čazma K3	2	45.752674	16.583326	102	22	Nafraiture 1I ter	8	49.907281	4.900151	392
5	Čazma K23		45.753378	16.582857	102	23	Nafraiture 3I		49.916362	4.891765	386
6	Čazma K40		45.752746	16.582349	102	24	Nafraiture P		49.918326	4.928948	393
7	Brinje L2	3	45.026501	15.189707	543	25	Gembloux N2	9	50.504478	4.674031	154
8	Brinje L3		45.001524	15.251416	617	26	Gembloux 1III		50.532666	4.694169	165
9	Brinje L4		44.999181	15.304540	536	27	Gembloux 7II		50.594333	4.782738	185
10	Ivanšćica L1	4	46.179721	16.120705	983	28	Chevetogne A	10	50.223330	5.085148	300
11	Ivanšćica L3		46.182698	16.126570	1024	29	Chevetogne 4II		50.236354	5.133941	255
12	Ivanšćica L5		46.187402	16.108232	881	30	Heer 3II	11	50.168458	4.830210	169
13	Delnice L3.1	5	45.371343	14.781120	701	31	Rulles 1IIF		49.741326	5.556740	411
14	Zalesina L3.2		45.383509	14.873481	781	32	Rulles 2IIpet		49.737420	5.585857	415
15	Vrbovsko L1		45.394888	15.050631	387	33	Floriffoux 3I	13	50.463922	4.771629	177
16	Vrbanske šume 91B.1	6	45.034364	18.980042	80						
17	Vrbanske šume 91B.2		45.032798	18.981058	80						
18	Vrbanske šume 91B.3		45.035301	18.983154	80						

Legenda: *Fraxinus angustifolia*; *Fraxinus excelsior*

Morfološke odlike rasta izolata promatrane su zasebno. Čiste kulture odabranih izolata gljive *H. fraxineus* (Tablica 3; Tablica 47) su pripremljene na 2% MEA (Oxoid™ CM0059) agar mediumu u tri replike za svaki izolat u svrhu testiranja rasta micelija patogena pri različitim temperaturama (10 °C, 20 °C i 30 °C). Rast micelija različitih izolata iz različitih lokacija i klimatskih uvjeta izuzetno je bitan zbog shvaćanja biologije patogena, te njegove mogućnosti prilagodbe na različite uvjete, kao otkrivanje restriktivne mogućnosti širenja zbog okolišnih uvjeta. Mjerenja rasta micelija provedena su dva puta tjedno (svaka 3.5 dana) mjerenjem micelija u sva četiri smjera (križ) na poledini petrijevke u ukupnom trajanju od 14 dana. Sve replike kolonija su poslikane zasebno za svaki izolat na 10 °C i 20 °C (pri 30 °C nije bilo rasta izolata). Kolonije koje nisu raste na 30 °C vraćene su na temperaturu od 20 °C na vremenski period od 14 dana da se utvrdi stopa preživljavanja izolata nakon 14 dnevnog tretiranja na temperaturi od 30 °C i mogućnost daljnjeg rasta prilikom izloženosti oscilacijama temperature.

#### 2.2.4. Molekularne analize izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

Za potrebe molekularne analize, izolati su skupljani na već potvrđenim lokacijama s prisutnošću patogena *H. fraxineus*. Izolati su raspoređeni da obuhvate kompletno područje rasprostranjenja bolesti od krajnjeg istoka Hrvatske u istočnoj Posavini na poljskom jasenu, do sjevernog područja Hrvatske odnosno Zagorja na običnom jasenu, pa do zapadnog i južnog dijela Gorskog kotara i Like također na običnom jasenu (Slika 12; Tablica 48). Ukupno je odabrano 18 reprezentativnih hrvatskih izolata (Tablica 3). Također skupljani su izolati u

Kraljevini Belgiji u južnom području Kraljevine na područje najveće problematike sušenja uslijed djelovanja patogena *H. fraxineus* (Slika 13; Tablica 48). Ukupno je odabrano 15 reprezentativnih belgijskih izolata (Tablica 3). U obje države grančice sa simptomima sušenja (maksimalni promjer grančica 1.5 cm) su sakupljane i analizirane unutar 48 h. Dijelovi biljnog tkiva (drveni materijal bez kore, kora ili dijelovi lista) su dezinficirani otopinom natrij hipoklorita (NaOCl) s 0.4 % aktivnog klora (20 s) isprani tri puta ultra čistom destiliranom sterilnom vodom, izrezani u komadiće veličine otprilike 5 mm<sup>2</sup> i stavljeni na 2 % MEA medium (Oxoid<sup>TM</sup> CM0059) kojem je nadodano 100 mg/l streptomycin sulfata (Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim, Germany). Petrijeve zdjelice su inkubirane na 20 °C u mraku tijekom 5 – 7 dana i potom presađene subkulture na 2 % MEA medium (Oxoid<sup>TM</sup> CM0059) bez dodatka antibiotika i inkubirane na 20 °C tijekom sljedećih 4 – 5 tjedana.

Usporedbom *H. fraxineus* populacija iz Hrvatske i Belgije, koje se razvijaju u potpuno različitim ekološkim i klimatskim uvjetima, s ogromnom razlikom prostorne distribucije izolata, gdje se jedna nalazi u sjevero-zapadnom, a druga u jugo-istočnom dijelu Europskog kontinenta, s vremenskom poveznicom gotovo identičnog početka epidemije patogena, te sličnog prvog nalaza, sa samo dvije godine razlike, dobivamo vrijedne informacije o genetskoj strukturi gljivične populacije. Cilj ovog istraživanja bio je da saznanja ovog tipa mogu značajno pridonijeti boljem razumijevanju epidemiologije bolesti, stoga može biti izuzetno korisno u kontinuiranoj potrazi za adekvatnim mjerama prevencije bolesti.

Utvrđivanje prisutnosti *H. fraxineus mitovirus 1* (HfMV1), koji je prvi put otkriven i opisane su metode njegove detekcije u istraživanju (Schoebel et al. 2014), može nam dati bolja saznanja o mogućnostima različitog ponašanja gljivičnih izolata kod stvaranja šteta na domaćinima, uzrocima sušenja, produkcije nekrotičnih lezija, širenju bolesti itd. Ponajviše daje nam mogućnost borbe protiv širenja patogena, način kako ga kontrolirati, te mogućnost reduciranja šteta i infekcija u već zahvaćenim bolesnim područjima. Upravo iz svih navedenih razloga dio ovog istraživanja posvećen je detekciji HfMV1 u dobivenim izolatima patogena *H. fraxineus*, te mogućnostima njegove upotrebe u kontroli bolesti kroz testove patogenosti i hipovirulentnosti.

Zadaci koji su zahvaćali ovo istraživanje obuhvaćali su rad s *H. fraxineus* izolatima, utvrđivanje prisutnosti *H. fraxineus mitovirus 1* (HfMV1), RNA ekstrakciju, genetsku karakterizaciju izolata, DNA ekstrakciju, PCR – bazirane tehnike, mikrosatelitne analize, te analizu molekularnih podataka.

Ove su analize obavljene u Wallon Agricultural Research Centre (CRAW), Life Sciences Department, Gembloux, u Kraljevini Belgiji, a ciljevi ove Short Term Scientific Mission (STSM) projekta bili su usporedba dviju populacija *H. fraxineus* sakupljenih u 2015. godini na *Fraxinus* spp. u državama s kontrastnim klimatskim uvjetima u Europi (Belgija i Hrvatska). Također da se pojača znanje i praktičnost mladog znanstvenika u polju molekularnih metoda za detekciju i genetsku karakterizaciju gljivičnog patogena i njegovog mikovirusa, kao i unaprijeđenje znanja nove bolesti jasena u Europi upotrebom novih naučenih tehnika molekularne biologije u Hrvatskoj.

Svi izolati pripremljeni su unaprijed prema već opisanim metodama dobivanja čistih kultura u skladu s EPPO PM 7/117 (1) protokolom za dijagnozu (EPPO 2013). Svi izolati rasli su na istoj hranidbenoj podlozi koja je pripremana po istoj recepturi, te su pohranjeni na rast u komoru na 20 °C u mraku.

#### **2.2.4.1. DNA ekstrakcija izolata *Hymenoscyphus fraxineus***

Prije početka procesa DNA ekstrakcije, potrebno je pripremiti uzorke za molekularnu analizu. Odabiru se izolati koji će se testirati, te se polažu u laminarij. Sa sterilnim skalpelom steriliziranim alkoholom i plamenom lagano se struže zračni micelij izrastao na površini agara. Vrlo je bitno da se micelij uzima što čišći da nebi došlo do bilo kakve inhibicije procesa DNA ekstrakcije zbog prisustva agar mediuma. Ostrugani izrasli micelij se polaže u 1.5 ml Eppendorf Safe – Lock micro test tubes, do označene razine od 0.5 ml što predstavlja dovoljnu količinu uzorka. Nakon toga prema protokolu razvijenom u CRAW centru (Chandelier et al. 2010) u posebnoj dekontaminiranoj prostoriji za izolaciju DNA započinjemo s protokolom (u prilogu Slika 80).

DNA ekstrakcija obavljena je iz micelija koji je dobiven iz uzgojenih subkultura odabranih izolata (Tablica 48). DNA ekstrakcija iz micelija obavljena je uz pomoć komercijalnog DNA kita NucleoSpin Plant II (Macherey – Nagel) prema usklađenom i definiranom protokolu za DNA ekstrakciju (u prilogu Slika 80). Za potrebe usitnjavanja uzorka nije korišten tekući dušik već je uzorak samljeven mikropistol štapićima u Eppendorf® tubi sa Safty lock mehanizmom. Svi uzorci DNA potom su stavljeni na čuvanje pri temperaturi od -20 °C. DNA ekstrakt je potom kvantificiran na spektrometru te je razrijeđen na 1 ng/μl za daljnju upotrebu. Ekstrakt DNA potom je stavljen ponovno na čuvanje na temperaturu od -20 °C.

#### 2.2.4.2. Real Time qPCR za detekciju *Hymenoscyphus fraxineus*

Protokol razvijen u CRAW (Wallon Agricultural Research Center, Gembloux, Belgium) (Chandelier et al. 2010) za detekciju *Hymenoscyphus fraxineus* uz pomoć real-time qPCR-a, je upotrijebljen za potvrdu identiteta patogena, za kvantifikaciju DNA (baziranu na ciklusnoj graničnoj vrijednosti Ct), te za provjeru odsutnosti DNA kontaminacije tijekom DNA ekstrakcijskog postupka (u prilogu Slika 81).

Za qPCR testiranje alikvot od 5 µl DNA je upotrijebljen u svakoj 20 µl PCR reakciji [1 x reakcijski pufer (qPCR Core Kit, Eurogentec, Liege, Belgium)]; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTPs; 0.25 µM TaqMan probe (Cf-S; dual-labelled probe, 5' FAM/3' BHQ-1, Eurogentec) (Slika 21) i 0.75 jedinica HotGoldStar Taq DNA polimeraze (qPCR Core Kit, Eurogentec). Amplifikacije su odrađene u ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) upotrebom sljedećih uvjeta: 10 min na 95 °C i 40 ciklusa na 95 °C u trajanju 15 s, 59 °C u trajanju 1 min (Chandelier et al. 2010). Derivacija rodamina Rox™ prisutna u PCR puferu (boja pasivne reference) je upotrijebljena kao pasivna referencija za normaliziranje signala. Prag ciklusa (Ct) korespondira s ciklusom pri kojem fluorescentni signal premašuje pozadinu. Ct – vrijednosti su procijenjene na bazne vrijednosti od 0.5 u svim slučajevima (bazični početak i kraj ciklusa, 2-15). Negativni uzorak s ultra čistom destiliranom vodom je uključen u svaki PCR test kao negativna kontrola.

Probe name	Type	Sequence
ITS-1 <sup>1</sup>	Primer	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3'
ITS-4 <sup>1</sup>	Primer	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Cf-F	Primer	5'-CCCTTGTGTATATTATATTGTTGCTTTAGC-3'
Cf-R	Primer	5'-GGGTCCTCTAGCAGGCACAGT-3'
Cf-S	Taqman probe	6-FAM – 5'-TCTGGGCGTCGGCCTCGG-3' – BHQ-1

<sup>1</sup>WHITE et al. 1990.

Slika 21. Sekvence baza početnica i Taqman sonde upotrijebljene u istraživanju (White et al. 1990)

Figure 21. Sequence of primers and Taqman probe used in this study (White et al. 1990)

#### 2.2.4.3. Mating types – određivanje idiomorfa seksualnih tipova odabranih izolata

Fragmenti SLA2 i APN2 gena su amplificirani u totalnom volumenu reakcije od 20 µl sukladno protokolu (Gross et al. 2012) upotrebom 5 ng DNA, 2 µl tampon 10x (reakcijski pufer 10x) (Promega, Dubendorf, Switzerland), 0.5 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl dNTPs 10 mM, 1 µl HP\_MAT1F (5 mM), 1 µl HP\_MAT1R (5 mM), 1 µl CF\_HMG\_F (5 mM), 1 µl

CF\_HMG\_R (5 mm), 7.8 µl ultračista destilirana voda, 0.2 µl *Taq* DNA polimeraza (Invitrogen). Amplifikacija se odvijala u GeneAmp PCR System 9700. Amplifikacijski program sastojao se od inicijalnog koraka denaturacije pri 94 °C u trajanju od 3 min, nakon čega slijedi 35 ciklusa denaturacije po 30 s pri temperaturi od 94 °C, 30 s zagrijavanja na 55 °C s produženjem od 30 s pri 72 °C. Nakon posljednjeg ciklusa dodatni elongacijski korak pri 72 °C temperature u trajanju od 5 min je nadodan u postupak. Nakon toga slijedi elektroforeza u 1.5 % agaroznom gelu koji sadrži boju GelRed u TAE puferu. Produkti amplifikacije HP\_MAT1 nalaze se na 1207 bp, a produkti amplifikacije CF\_HMG nalaze se na 571 bp. Protokol identifikacije idiomorfa je prikazan u prilogu (Slika 82).

#### **2.2.4.4. Genetska analiza *Hymenoscyphus fraxineus* izolata s RAMS bazama početnicama**

Genetska varijabilnost 33 izolata *H. fraxineus* (18 hrvatskih i 15 belgijskih) je determinirana upotrebom 6 RAMS (Random Amplified Microsatellites) baza početnica [DHB(CGA)<sub>5</sub>, DHB(ATG)<sub>5</sub>, BDB(ACA)<sub>5</sub>, DHB(AGC)<sub>5</sub>, CCTT, DBV(CAT)<sub>5</sub>] prema publikacijama (Kraj & Kowalski 2014; Kraj et al. 2012; Rytönen et al. 2011). PCR amplifikacija ribosomske DNA upotrebom ITS1 i ITS4 baza početnica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; (White et al. 1990)) je obavljena u totalnom volumenu od 25 µl reakcijske mješavine koja je sadržavala sljedeće: PCR pufer 10x (2.5 µl), MgCl<sub>2</sub> 50 mM [0.7 µl (1.4 mM u PCR reakciji)], dNTPs 10 mM [0.5 µl (200 mM u PCR reakciji)], baza početnica 20 µM (1.25 µl), sterilna ultračista voda (18 µl), *Taq* DNA polimeraza 5 u/µl [0.05 µl (0.25 U u PCR reakciji)], DNA otopina 1 ng/µl (2 µl). Amplifikacijska reakcija je slijedila sljedeću proceduru: inicijalna denaturacija pri 95 °C u trajanju od 5 min, zatim slijedi 36 ciklusa koji se sastoje od denaturacije pri 95 °C u trajanju 1 min, temperatura zagrijavanja koja je drukčija za svaku RAMS bazu početnicu u trajanju 45 s, i produljenje pri 72 °C u vremenu 2.5 min. Elongacija posljednjeg ciklusa je produljena na 8 min pri temperaturi od 72 °C (u prilogu Slika 83).

RAMS baze početnice i njihove temperature zagrijavanja u PCR reakciji bile su:

Kraj – CGA: 5' DHBCGACGACGACGACGA 3' temperatura: 61 °C (optimizirana na 59 °C)

Kraj – ATG: 5' DHBATGATGATGATGATG 3' temperatura: 46 °C

Kraj – AGC: 5' DHBAGCAGCAGCAGCAGC 3' temperatura: 60 °C (optimizirana na 59 °C)



Kraj – ACA: 5' BDBACAACAACAACAACA 3' temperatura: 49 °C

Kraj – CCTC: 5' CCCTCCCTCCCTCCCTCCCT 3' temperatura: 64 °C

Rytkönen – CAT: 5' DBVCATCATCATCATCAT 3' temperatura 50 °C

Za svaku bazu početnicu i za svaki izolat PCR amplifikacija je napravljena dva puta. Tijekom analize, amplifikacije iz obje reakcije su uzimane u obzir i dodijeljene su im jedna od dvije vrijednosti: prisutan (1) ili odsutan (0). PCR uvjeti (temperatura zagrijavanja, koncentracija magnezija u PCR reakciji) su optimizirani u CRAW-u tijekom istraživanja. PCR produkti su potom dalje riješeni elektroforezom u 1.5 % agaroznom gelu koji sadrži GelRed boju u TEA puferu. Upotrijebljena je DNA ljestvica od 100 bp kao standardni marker veličine. Genetska analiza se obavljala pomoću softvera Genealex 6.4.

#### **2.2.4.5. Testiranje prisutnosti mitovirusa HfMV1 u izolatima *Hymenoscyphus fraxineus***

Prvi korak u procesu testiranja prisutnosti mitovirusa HfMV1 bio je izolacija RNA iz izolata uz pomoć Norgen Plant/Fungi total RNA purification kit (Norgen Biotek Corp.). kit je upotrebljavan u skladu s protokolom proizvođača i protokolom razvijenim u CRAW-u s početnim uzorkom od 20 mg gljivičnog micelija po izolatu. Za RNA ekstrakciju nije korišten korak izborne DNaze. Komplementarna DNA (cDNA) je sintetizirana iz ukupne RNA s nasumičnim heksamer bazama početnicama upotrebom Maxima First Strand cDNA synthesis kit (ThermoScientific). Jedan mikrolitar (1 µl) cDNA je upotrebljen za svaku PCR amplifikaciju. Da bi se utvrdila rasprostranjenost virusa, upotrijebili smo početnice Cf4\_F1 i Cf4\_R3. Za izradu procjene prisutnosti RNA za amplifikaciju, u ovoj kontrolnoj PCR amplifikaciji jedan od aktin-specifičnih početnica prelazi preko intron–exon granice što omogućuje specifičnu amplifikaciju aktin cDNA (izvedenu iz aktin mRNA) od *H. fraxineus* (Tablica 4).

Tablica 4. Lista parova baza početnica za amplifikaciju i resekvencioniranje HfMV1, te nove baze početnice za specifičnu amplifikaciju actin gena *H. fraxineus* (Schoebel et al. 2014)

Table 4. List of primer pairs used for amplification and re-sequence the HfMV1, and new primers to specifically amplify the actin gene of *H. fraxineus* (Schoebel et al. 2014)

List of primer pairs used to amplify and re-sequence the *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 1 (HfMV1).

Name	Tm (°C)	Sequence (5'-3')	Region <sup>a</sup>	Location <sup>b</sup> (bp)
Cf_1F_2	59	GAGGGAGTAGAGACCCGAAAG	Region 1	1771-2361
Cf_1R_1	60	GCTGTCGGTCCACACCTAAT		
Cf_2F_3	60	ACACGATGGAAAGCCAGATT	Region 2	1138-1905
Cf_2R_1	60	CAAAGGGTGAAAATCCCTCA		
Cf_3c_Fwd	51	GATGAGAGAAGAAATGCGA	Region 3	757-1172
Cf_3c_Rev	50	ATTAAATGACGGTTGGG		
Cf_4F_1 <sup>c</sup>	60	ATTGTGGGTCTCCGAGAATC	Region 4	356-867
Cf_4R_3 <sup>c</sup>	60	ATCCGAATGAGCCACGTTC		

<sup>a</sup> The regions were numbered along the reverse complement sequence.

<sup>b</sup> Sequence location, not including primer sequences.

<sup>c</sup> Primer pair used for polymorphism testing and phylogenetic analyses.

New primers to specifically amplify the actin gene of *Hymenoscyphus fraxineus*. Primer CfAct\_90\_F spans across an intron-exon boundary of the actin gene.

Oligo name	Tm (°C)	Sequence (5'-3')	Fragment size
CfAct_90_F	56	GCCGTCTTCTCTCTATTGT	300 bp
CfAct_350_R	56	TGGGTGATCTTCTCTCTGT	

Sve PCR reakcije su provedene elektroforezom kroz 1.5 % agarozni gel. Uzorak se smatrao mitovirus pozitivnim ako je producirao i virus -specifične i aktin - specifične PCR produkte ili mitovirus – negativan ako je samo aktin – specifični PCR produkt amplificiran. Amplifikacija bez aktin – specifične i bez virus – specifične PCR oznake smatrala se kao indikacija neuspjelog pokušaja dobivanja amplifikativne RNA. Svi koraci ovog testiranja rađeni su u skladu s publikacijom (Schoebel et al. 2014). Za ovo testiranje u CRAW-u su izrađeni posebni protokoli jedan za RNA ekstrakciju (u prilogu Slika 84), drugi za cDNA sintezu (u prilogu Slika 85), a treći za PCR amplifikaciju (u prilogu Slika 86). Nakon elektroforeze očitavao se signal za kontrolu pri 300 bp i za virus pri 511 bp.

PCR amplifikacija obavljena u totalnom volumenu od 20 µl reakcijske mješavine koja je sadržavala sljedeće: PCR pufer 10x (2 µl), MgCl<sub>2</sub> 50 mM (0.5 µl), dNTPs 10 mM (0.5 µl), baza početnica1 5 µM (2 µl), baza početnica2 5 µM (2 µl) sterilna ultračista voda (11.8 µl), Taq DNA polimeraza (0.2 µl), DNA otopina 1 ng/µl (1 µl).

PCR uvjeti za amplifikaciju su bili: 2 min inicijalne denaturacije pri temperaturi od 94 °C, nakon čega slijedi 33 ciklusa koji se sastoje od: 1 min pri 94 °C, 90 s pri 55 °C (regija 3 – 4), 2 min pri 72 °C i 8 min finalne elongacije pri 72 °C.

#### 2.2.4.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu u nativnim uvjetima

Elektroforeza u agaroznom gelu standardna je metoda za brzu i jednostavnu analizu DNA (identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje DNA). Najvažniji čimbenici koji utječu na učinkovitost razdvajanja DNA su koncentracija agaroze, molekularna veličina i konformacija DNA, jakost i smjer električnog polja, prisutnost interkalirajućih boja (etidijevog bromida) te sastav pufera za elektroforezu. Elektroforezu DNA u agaroznom gelu moguće je provoditi u nativnim uvjetima (u kojima DNA prolazi kroz gel u dvolančanom obliku) ili denaturirajućim uvjetima (u kojima DNA prolazi kroz gel u jednolančanom obliku).

U ovom poglavlju opisana je standardna elektroforeza DNA u nativnim uvjetima u električnom polju stalne jakosti i smjera kojom je moguće razdvojiti molekule dvolančane DNA duljine od 50 pb do 50 kb.<sup>1</sup>

#### MATERIJALI:

TAE pufer (50 x):

2 M Tris-acetat

50 mM EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) (pH 8.0)

Priprema 1 L: 242 g Tris, 57.1 mL ledene octene kiseline, 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Etidijev bromid (10 mg/mL)<sup>2</sup>

1 x TAE pufer s etidijevim bromidom (0.5 µg/mL)<sup>3</sup>

LE agaroz (engl. low electroendosmosis agarose)

Pufer za nanošenje uzoraka (6 x):

50 % glicerol 20 mM EDTA

0.25 % Orange G boja (Merck)<sup>4</sup>

Standard za duljinu odsječaka DNA<sup>5</sup>

0,5 M EDTA (pH 8.0)

#### LABORATORIJSKA OPREMA:

uređaj za vodoravnu elektroforezu u agaroznom gelu (kalup za izlijevanje gela, češalj, kadica za elektroforezu, izvor napona struje), vaga, mikrovalna pećnica, transiluminator i/ili prijenosna UV - svjetiljka (valne duljine 302 nm), polaroid kamera ili digitalni uređaj za snimanje gelova pod UV svjetlom (npr. Image - Master ili slično).

#### POSTUPAK:

1. Pripremiti 0.8 – 1.5 % gel<sup>6</sup> dodatkom izvagane agaroze u 1 x TAE pufer s etidijevim bromidom<sup>7</sup>. Rastaliti agarozu u mikrovalnoj pećnici zagrijavanjem do vrenja.<sup>8</sup> Ohladiti agarozu do približno 50°C.<sup>9</sup>
2. Pripremiti kalup za izlijevanje gela.<sup>10</sup> Ne zaboraviti umetnuti češalj kako bi se u gelu formirale jažice.
3. Izliti agarozu u pripremljeni kalup, a eventualne mjehuriće ukloniti s površine gela nekim šiljatim predmetom (npr. vrhom plastičnog nastavka za pipetu).
4. Pustiti gel da se skrutne na sobnoj temperaturi tijekom 30-45 min, izvaditi češalj, skinuti ljepljivu traku (ukoliko je kalup pripremljen pomoću ljepljive trake) i smjestiti gel u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi 1 x TAE pufer (s etidijevim bromidom<sup>7</sup>) tako da pufer u potpunosti prekriva gel (dovoljno je da razina pufera bude 1 mm iznad površine gela).<sup>11</sup>
5. Pripremiti uzorke dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka na gel. Pufer u konačnici treba činiti 1/6 ukupnog volumena uzorka, odnosno njegova konačna koncentracija treba biti 1 x (npr. u 15 µl uzorka dodati 3 µl pufera za nanošenje). Dobro promiješati uzorak pipetiranjem.
6. Uzorke pipetirati u jažice gela. Paziti da se uzorci ne prelijevaju izvan jažica, odnosno da ne "isplivaju".<sup>12</sup> Ukoliko je potrebno, u zasebne jažice može se nanijeti standard veličine odsječaka i/ili neku DNA poznate koncentracije prema kojoj je moguće odrediti koncentraciju nepoznate DNA.
7. Uključiti izvor napona struje i provoditi elektroforezu uz voltažu ~5 V/cm gela sve dok se narančasta boja ne približi suprotnom rubu gela.<sup>13</sup>

8. Nakon završene elektroforeze, gel fotografirati pomoću uređaja za snimanje agaroznih gelova.<sup>14</sup> Prag vidljivosti pruge DNA obojene etidijevim bromidom je oko 25 ng.

Dodatna objašnjenja:

<sup>1</sup> Molekule DNA većih duljina moguće je razdvojiti elektroforezom u promjenjivom električnom polju, dok je za razdvajanje molekula DNA manjih duljina pogodna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.

<sup>2</sup> Etidijev bromid je opasna mutagena tvar te s njom treba rukovati vrlo oprezno i uz upotrebu zaštitnih sredstava (jednokratnih, najbolje nitrilnih rukavica). Sve otopine i gelovi koji sadrže etidijev bromid moraju prilikom odlaganja biti tretirani prema propisima o opasnom otpadu.

<sup>3</sup> 1 x TAE pufer dobiva se razrjeđivanjem koncentriranog TAE pufera (50 x). Osim u 1 x TAE puferu, elektroforezu je moguće provoditi u 0.5 x TBE puferu. TAE pufer ima znatno manji puferski kapacitet od TBE pufera i znatno brže se "istroši", pa je za vrlo dugotrajne elektroforeze pogodniji TBE pufer.

<sup>4</sup> U ovome puferu se koristi narančasta boja Orange G koja putuje brzinom linearnih dvolančanih odsječaka DNA duljine 70-80 pb, no postoje i druge boje koje su u širokoj upotrebi. Primjerice radi se o plavoj boji bromfenol-plavo (engl. *bromophenol-blue*) koja putuje brzinom odsječaka DNA duljine 300 pb i ksilencijanolu FF (engl. *xylene cyanol FF*) koji putuje brzinom odsječaka DNA duljine 4 kb. Prema potrebama pokusa moguće je odabrati neku od ovih boja, ili njihove kombinacije (česta je kombinacija bromfenol-plavo + ksilencijanol FF). Sve ove boje se pripremaju u koncentraciji od 0,25% u osnovnoj smjesi pufera za nanošenje uzoraka na gel.

<sup>5</sup> Postoji veliki broj komercijalnih standarda duljine odsječaka DNA koji se sastoje od različitog broja i raspona duljine odsječaka. Izbor standarda koji će biti upotrijebljen u određenom pokusu elektroforeze ovisi o specifičnim zahtjevima tog pokusa, odnosno o očekivanoj duljini ispitivanih odsječaka koji se razdvajaju elektroforezom.

<sup>6</sup> Gustoća gela (odnosno, koncentracija agaroze u gelu) ovisi o očekivanoj duljini molekula DNA koje želimo razdvojiti: kraće molekule DNA se bolje razdvajaju u gušćem gelu, a za uspješno razdvajanje duljili molekula DNA potreban je nešto rjeđi gel. Osim toga, agaroze

raznih proizvođača mogu se različito “ponašati”, pa je najbolje iskustveno odrediti koja koncentracija agaroze je najpogodnija za specifičnu svrhu.

<sup>7</sup> Elektroforezu je moguće provoditi i bez dodanog etidijevog bromida (u gelu i elektroforetskom puferu), pa naknadno provesti bojenje gela. Alternativno se etidijev bromid može dodati samo u uzorak.

<sup>8</sup> Potrebno je dva do tri puta naizmjenično zagrijati agarozu do vrenja (u tikvici zatvorenoj “konkavno” udubljenim poklopcem od papira ili plastične kuhinjske folije), pazeći pri tome da ne iskipi izvan tikvice, te ju lagano ohladiti na neznatno nižu temperaturu i time osigurati da se sasvim rastalila. Smjesa mora biti potpuno prozirna, bez vidljivih ostataka agaroze.

<sup>9</sup> Gel se može ohladiti postupno, na sobnoj temperaturi, uz povremeno kružno potresanje tikvice. Znatno brže može se ohladiti ispod mlaza hladne vode, uz snažno kružno potresanje tikvice kako bi se spriječilo skrutnjavanje agaroze uz stijenke tikvice. Ovaj drugi način ipak se ne preporučuje “početnicima”. Kako znati u kojem trenutku je agarozu dovoljno ohlađena? Tikvicu ohlađenu do približno 50 °C možemo držati u ruci, na dlanu, bez osjeta “pečenja”.

<sup>10</sup> Najčešće se kalup priprema lijepljenjem samoljepljive trake na “otvorene” stranice. Ovisno o modelu uređaja u kojem se provodi elektroforeza, kalup se može pripremiti i na neki drugi način, npr. umetanjem u još jedan “vanjski” kalup ili sl.

<sup>11</sup> Pri smiještanju gela u elektroforetsku kadu treba paziti na njegovu orijentaciju: negativno nabijene molekule DNA u električnom polju putuju prema pozitivnom polu (anodi).

<sup>12</sup> Pripazite: ukoliko uzorak koji nanosite na gel sadrži ostatke etanola, može se dogoditi da uzorak ispliva iz jažice. Ukoliko je zapremina jažice manja od ukupnog volumena uzorka koji želite razdvojiti elektroforezom, uzorak je potrebno pretaložiti dodatkom 1/10 volumena 3 M natrijevog acetata (pH 5.2) te 2.5 volumena hladnog 95 % etanola. Uzorak taložite približno 30-60 minuta na -80 °C, centrifugirajte 15 minuta, isperite talog hladnim 75 % etanolom, centrifugirajte 7 minuta, osušite talog na zraku te ga posušenog resuspendirajte u odgovarajućem volumenu 1 x TE pufera.

<sup>13</sup> Tijekom elektroforeze moguće je provjeriti napredovanje (pokretljivost) uzoraka u gelu pomoću prijenosne UV - svjetiljke ili transiluminatora. Produljeno izlaganje UV - svjetlu uzrokuje cijepanje molekula DNA, pa ukoliko su nam pojedini odsječki potrebni za kasniju upotrebu (npr. za PCR), poželjno je gel što kraće izlagati UV - svjetlu.

<sup>14</sup> Ukoliko je potrebno za kasniju lakšu orijentaciju (npr. ako je uzorke s gela potrebno ponijeti na najlonsku membranu), može se oštrim nožićem odsjeći jedan od uglova gela (prema vlastitom izboru). Prilikom fotografiranja uz gel se može prisloniti fluorescirajuće ravnalo kako bi se kasnije lakše odredio položaj molekula DNA u gelu.

Postupak pripreme te upotrebljavani materijali opisani su sukladno publikaciji (Green & Sambrook 2012).

#### **2.2.4.7. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu u denaturirajućim uvjetima**

Elektroforeza DNA u denaturirajućim uvjetima koristi se nakon sinteze cDNA jer omogućava detekciju sekundarnih struktura u cDNA (tzv. struktura ukosnice - engl. *hairpins*, koje mogu nastati kod sinteze prvog ili drugog lanca cDNA) te daje pregled veličina sintetiziranih lanaca cDNA.

#### **MATERIJALI:**

Lužnati pufer (10 x):

300 mM NaOH

20 mM EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) (pH 8.0)

Priprema 1 L: 60 mL 5 M NaOH, 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), dopuniti do 1 L

1 x lužnati pufer

LE agaroz (engl. low electroendosmosis agarose)

Lužnati pufer za nanošenje uzoraka (2 x):

20% glicerol

25 mM NaOH

4,6% bromfenol-plavo

Kontrolna cDNA (1.8 kb)

#### **LABORATORIJSKA OPREMA:**

uređaj za vodoravnu elektroforezu u agaroznom gelu (kalup za izlijevanje gela, češalj, kadica za elektroforezu, izvor napona struje), vaga, mikrovalna pećnica



#### POSTUPAK:

1. Pripremiti 1% gel dodatkom izvagane agaroze u 1 x lužnati pufer. Rastaliti agarozu u mikrovalnoj pećnici zagrijavanjem do vrenja, izliti gel i pripremiti ga za elektroforezu smještanjem u kadu za elektroforezu s 1 x lužnatim puferom.
2. Pripremiti uzorke dodavanjem lužnatog pufera za nanošenje uzoraka tako da pufer u konačnici čini 1/2 ukupnog volumena uzorka, odnosno tako da njegova konačna koncentracija bude 1 x. Dobro promiješati uzorak i pipetirati ga u jažice gela. U zasebne jažice se nanosi kontrolna reakcija sinteze cDNA veličine 1.8 kb.
3. Uključiti izvor napona struje i provoditi elektroforezu uz jakost struje 100 mA (odnosno uz voltažu ~ 5 V/cm gela) sve dok plava boja ne dosegne 2/3 duljine gela. Pratiti temperaturu u puferu. Ukoliko se temperatura pufera povisi iznad 37 °C, smanjiti jakost struje.
4. Nakon završene elektroforeze, gel zapakirati u plastičnu vrećicu te na njega položiti autoradiografski film. Eksponirati tijekom jednog sata ili dulje.

#### **2.2.5. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća *Fraxinus* spp.**

Zbog kompleksnog životnog ciklusa gljive *H. fraxineus*, te različite osjetljivosti biljke koja se može manifestirati kroz biljno i/ili drveno tkivo (Kirisits & Freinschlag 2012), jedan od preliminarnih prvih istraživanja na izolatima patogena bio je testiranje brzine rasta odabranih izolata gljive na četiri različite hranjive podloge u razdoblju od dva tjedna pri temperaturi od 20 °C. Ovaj pokus dizajniran je kao preliminarno istraživanje koje bi moglo pokazati razlike u rastu istih izolata na različitim hranidbenim podlogama, odnosno na podlogama s različitim dodacima ekstrakta lista triju autohtonih vrsta jasena u Hrvatskoj.

Prve tri hranidbene podloge sastojale su se od 2 % krumpirovog dekstroznog agara (PDA Oxoid™ CM0139) obogaćenih s ekstraktima lista uzetih od *F. excelsior*, *F. angustifolia* i *F. ornus* vrsta drveća, dok se četvrta hranidbena podloga (kontrolna) sastojala isključivo samo od 2 % agar mediuma (PDA Oxoid™ CM0139) bez ikakvih dodatnih primjesa. Sve četiri hranidbene podloge napravljene su bez dodatka antibiotika, da se izbjegne mogući utjecaj dodatnih kemijskih supstanci. Lišće jasena za istraživanje sakupljano je s individualnih stabala *F. excelsior* i *F. ornus*. Lišće *F. angustifolia* vrste sakupljano je s pet klonova koji su

kasnije upotrebljavani u istraživanju otpornosti klonova. Napravljen je uniformni uzorak miješanjem lišća svih pet klonova (BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38) koji pripadaju sjemenskoj regiji gornje Posavine, srednje Hrvatske i Pokuplja 1.2.3. Točno 50 g svježih fragmenata lista, koji pripada jednoj vrsti jasena, dodan je svakoj litri PDA mediuma prethodno napravljenog s dodatkom 39 g agar praška ((PDA Oxoid™ CM0139) rastopljenog u jednoj litri destilirane vode (slično kao u istraživanjima Kirisits et al. 2013; Carrari et al. 2015).

Lišće je prije fragmentacije sa sterilnim skalpelom površinski prebrisano, očišćeno i oprano, te površinski sterilizirano vatenim jastučićima natopljenim 70 % etanolom, a zatim isprano tri puta sterilnom destiliranom vodom. PDA medium s fragmentima lista je zatim autoklaviran 15 min pri temperaturi od 121 °C. Medium je potom izlijevan kroz sterilno cjedilo tako da su fragmenti lista odvojeni i odstranjeni prije izlijevanja mediuma u petrijeve zdjelice. Naposljetku, volumen od 20 ml svakog mediuma je preliven u 90 mm plastične petrijeve zdjelice u laminariju. Deset replika čistih kultura svakog izolata su presađene na svaki tip hranidbene podloge, te je njihov rast mjeren svaka dva dana na četiri nasuprotne strane (križ) na petrijevim zdjelicama. Ukupno razdoblje mjerenja rasta izolata za svaki tip hranidbene podloge iznosio je 14 dana. Prosječna stopa rasta (izračunata kao prosjek razlike rasta između dva mjerenja) je uzimana kao relevantna za statističke analize.

U istraživanju upotrebljavana su dva izolata patogena *H. fraxineus*. Izolati 1 i 2 patogena *H. fraxineus* upotrijebljeni za testiranje rasta na različitim hranidbenim podlogama dobiveni su izolacijom u proljeće 2014. godine s lokacije prvog nalaza *H. fraxineus* u Republici Hrvatskoj na običnom jasenu u Gorskom kotaru, iz područja Nastavno pokusnog šumskog objekta Zalesina (G.J. Belevine), Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izolat 1 dobiven je s mikrolokacije koordinata 45.383858° S, 14.873822° I, izolacijom patogena iz soliternog stabla *F. excelsior* s vidljivim simptomima bolesti, promjera 20 cm i visine 18 m, iz uzorka drvnog tkiva poprečnog presjeka debla približno na jedan metar visine od razine tla. Izolat 2 dobiven je s mikrolokacije koordinata 45.385710° S, 14.872510° I, izolacijom patogena iz soliternog mladog stabla *F. excelsior* s vidljivim simptomima bolesti, promjera 4 cm i visine 3 m, iz uzorka izbojaka u krošnji s vidljivim nekrozama, te je uzorak tkiva za samu izolaciju uzet iz drvnog tkiva odmah ispod sloja kore. Uzorak izbojka uzet je s približno dva metra visine od razine tla.

## 2.2.6. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata patogenog *Hymenoscyphus fraxineus*

Istraživanje je provedeno u cilju utvrđivanja utjecaja različitih valnih duljina svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata gljive *H. fraxineus*.

### Utjecaj UV svjetlosti na rast izolata

Prvi dio istraživanja bazirao se na utvrđivanju utjecaja različitih valnih duljina svjetlosti na rast izolata gljive *H. fraxineus*. Tablica 5 prikazuje odabrane izolate gljive *H. fraxineus* korištene u istraživanju.

Tablica 5. Odabrani izolati patogenog *H. fraxineus* za testiranje utjecaja UV svjetlosti na rast patogenog

Table 5. Pathogen *H. fraxineus* chosen isolates for growth testing under UV light treatment

Broj izolata	Izolat / Lokacija	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	Nadmorska visina	Tip idiomorfa	HfMV1
1	Nova Gradiška K1	45.252200	17.361963	112	1	1
2	Čazma K23	45.753378	16.582857	102	1	1
3	Brinje L3	45.001524	15.251416	617	1	0
4	Ivanščica L1	46.179721	16.120705	983	2	0
5	Zalesina L3.2	45.383509	14.873481	781	1	1
6	Soulmes 1II	50.199408	4.742941	202	1	0
7	Nafraiture P	49.918326	4.928948	393	2	0
8	Gembloux 7II	50.594333	4.782738	185	2	0
9	Chevetogne 4II	50.236354	5.133941	255	2	1
10	Heer 3II	50.168458	4.830210	169	2	1

Legenda: *Fraxinus angustifolia*; *Fraxinus excelsior*

Od 10 odabranih izolata napravljeno je po 10 replika čistih kultura, što je ukupno 100 replika koje su postavljene u identične uvjete temperature i vlage. Izolati su rasli na temperaturi od  $20 \pm 0.5$  °C u omjeru mrak:svjetlo 12:12 h, tj. 12 h u mraku i 12 h pod svjetlom određene UV valne duljine. Testirano je djelovanje ultravioletnih zraka svjetlosti UVB spektra (valnih duljina 280 – 315 nm), UVA spektra (valnih duljina 315 – 400 nm), te vidljivog dijela spektra (valnih duljina 390 – 750 nm). Na svaki spektar UV svjetlosti testiralo se 10 replika svakog izolata (10 izolata), dok se za kontrolu testiralo 10 replika svakog izolata (10 izolata) koje su rasle bez utjecaja svjetlosti (u mraku) kroz isti vremenski period. Mjerenje za svaki UV spektar se provodilo u periodu od 3 tjedna odnosno 21 dan. Rast izolata pratio se u pravilnim razmacima dva puta tjedno.

Istraživanje se provodilo unutar klima komore TermoMedicinskiAparati BTES-e frigomat koja je opremljena s lampama OSRAM DULUX® S BLUE 71 COLOR 9w (UVB), OSRAM DULUX® S BLUE UVA 78 COLOR 9w (UVA) i PHILIPS PL-S UVB 9w (vidljivi spektar). Lampe su postavljene dijagonalno nasuprotno za najbolju izloženost svjetlosnom djelovanju, te emitiraju točno određene valne duljine ultravioletne svjetlosti. Svaka replika izolata je pregledana te je izmjeren rast izolata u četiri različita smjera (gore, dolje, lijevo, desno) od centralnog presađenog čepića s kulturom gljive. Rast se mjerio u milimetrima (mm), a vrijednost rasta izolata između dva mjerenja dobivena je razlikom vrijednosti između dva susjedna mjerenja. Na taj način mogli smo detaljno pratiti fluktuacije ili kontinuitet stope rasta iako su okolišni uvjeti bili nepromijenjeni i kontrolirani.

### Utjecaj UV svjetlosti na fruktifikaciju izolata

Iste replike izolata koji su upotrebljavani za testiranje djelovanja valnih duljina UV svjetlosti, nakon isteka perioda od 21 dan pod djelovanjem određenog UV svjetla, upotrebljavani su za određivanje sporulacije odnosno fruktifikacije gljive. Konidije gljive *Chalara fraxinea* svake pojedine replike izolata brojane su da se utvrdi kvantitativna vrijednost produciranih spora. Usporedbom kvantifikacijskih vrijednosti spora pojedinog izolata omogućuje nam utvrđivanje varijabilnosti unutar izolata i između različitih izolata, te dobivanje podataka o utjecaju različitih valnih duljina UV svjetlosti na iste izolate patogena. Istraživanjem je moguće utvrditi postoji li veza između smanjene ili povećane fruktifikacije gljive pod djelovanjem određenog spektra UV svjetlosti.

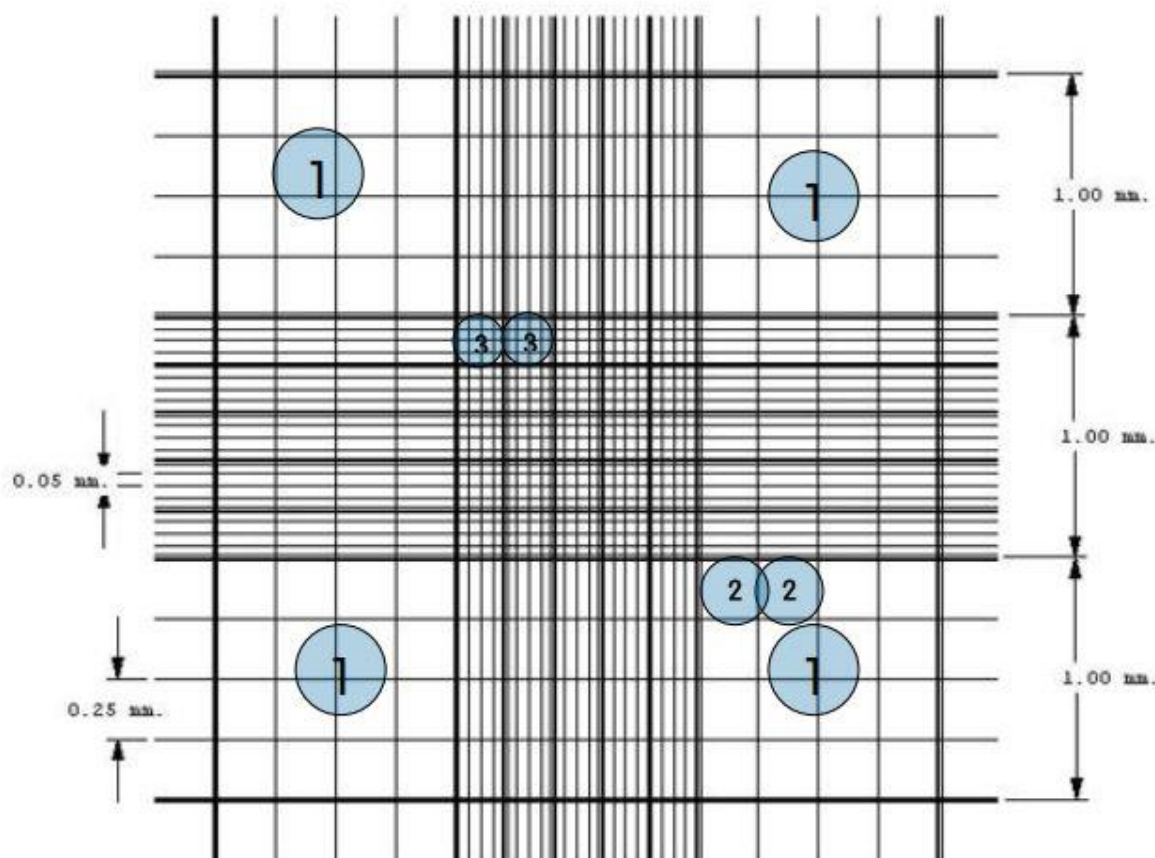
Za kvantifikaciju konidija gljive *C. fraxinea* upotrebljavana je Neubauer komorica za brojanje spora/stanica (Hemocitometar). Unatoč činjenici velikih tehnoloških dostignuća znanstvenih laboratorija, Neubauer komorica ostaje do dan danas najupotrebljivijom metodom kvantifikacije stanica i spora. Neubauer komora je debela kristalno staklena podloga za mikroskopske uzorke istih dimenzija kao i obično predmetno stakalce (30 x 70 mm i 4 mm debljine). Slika 22 prikazuje opremu korištenu u procesu kvantifikacije spora. Postoje komorice s jednostavnom jednom centralnom komorom, ali u ovom istraživanju upotrebljavan je hemocitometar s dvije komorice. Kod hemocitometra s dvostrukim komoricama svaka se može puniti neovisno, te na taj način u istom procesu može se izvršiti simultano dva brojanja te na taj način ponovno provjeriti svaki rezultat.

Svaka komorica sadržavala je svoju iscrtanu mrežu za brojanje dimenzija 3 x 3 mm koje su podijeljene na 9 subdivizija širine 1 mm (Slika 23). Centralni kvadrant je bio podijeljen na 25 kvadranata širine 0.25 mm (250  $\mu$ m), a svaki od 25 kvadranata je još bio podijeljen na unutrašnjih 16 kvadranata širine 0.05 mm. Stoga, centralni kvadrant je bio sastavljen od 400 manjih kvadranata. Pokrovno stakalce predstavlja kvadratno stakalce dimenzija 22 x 22 mm. Pokrovno stakalce postavljalo se na Neubauer komoricu tako da pokriva središnji dio. Pokrovno stakalce ostavljalo je prostor za koncentraciju spora između dna komorice i samog pokrova. Komorica je dizajnirana tako da udaljenost između dna komore i pokrovnog stakalca iznosi 0.1 mm. Stakalce prilikom izmjere ne smije biti izdignuto jer inače proračuni za mjerenje koncentracije neće biti točni. Mikropipetama se omogućavalo precizno uzimanje uzorka tekućine koja se postavljala u komoricu.



Slika 22. a) stanična otopina ili otopina spora; b) Hemocitometar, Neubauer komorica; c) svjetlosni mikroskop; d) pokrovna stakalca; e) pipeta i mikropipeta s jednokratnim vrhovima; f) pufer za razrjeđivanje (PBS)

Figure 22. a) cellular (spore) dilution to measure; b) Hemocytometer, Neubauer chamber; c) optical microscope; d) cover glass; e) pipette and micropipette with disposable tips; f) dilution buffer /PBS



Slika 23. Mreža za brojanje spora u Neubauer komorici

Figure 23. Neubauer chamber grid for counting spores

Tipično koncentracijski okvir za brojanje spora je između 250000 spora/ml i 2.5 milijuna spora/ml tekućine. Preporučljivo je da otopina koncentracije bude oko  $10^6$  spora / ml (1 milijun spora/ml). S koncentracijama ispod 250000 spora / ml ( $2.5 \cdot 10^5$  spora/ml) broj prebrojanih spora nije dovoljan za dobivanje realne procjene originalne koncentracije. Iznad 2.5 milijuna spora / ml ( $2.5 \cdot 10^6$  spora/ml) vjerojatnost pogreške pri brojenju raste kao i vrijeme i napor uloženi za dobivanje realne vrijednosti. Iznad 2.5 milijuna preporuča se razvodnjavanje tekućine uzorka kako bi se dobila finalna koncentracija bliže optimumu 1 milijun/ml. Važno je zapisati razvodnjavanje uzorka da se može kasnije korigirati matematički izračun.

U 10 ml demineralizirane ultračiste vode dodalo se 1 ml (1 %) TWEEN® 80 (SIGMA – ALDRICH CHEMIE, GmbH). Tu se otopinu u količini 1000  $\mu$ l mikropipetom prelijevalo u petrijevku preko izraslog micelija gljive, zatim se staklenim štapićem lagano prelazilo preko cijelokupne površine micelija istiskajući fialide i otpuštajući konidiospore. Nakon toga mikropipetom se uzimao uzorak 10  $\mu$ l tekućine sa sporama iz petrijevke i postavljao se na

Neubauer komoricu u prvu komoru, te ista količina tekućine u drugu komoru, zatim se komorice prekrivalo pripadajućim pokrovnim stakalcem. Nakon toga slijedio je protokol mikroskopiranja (Slika 24).

**STEP 2. Introducing the sample into the Neubauer chamber**

Take 10  $\mu$ l of dilution prepared in STEP 1 with the micropipette.

- 1) Put the glass cover on the Neubauer chamber central area. Use a flat surface to place the chamber, like a table or a workbench.
- 2) Put a disposable tip at the end of the micropipette.
- 3) Adjust the micropipette to suck 10  $\mu$ l. You can adjust it by turning the upper plunger roulette to select the required pipetting volume.
- 4) Introduce the micropipette tip on the dilution previously prepared (STEP 1)
- 5) Push the pipette plunger slowly until you feel it has arrived to the end of its travel.
- 6) Remove the pipette tip from the dilution, and bring it to the Neubauer chamber. When the pipette is loaded, it must always be held in vertical position.
- 7) Place pipette tip close to the glass cover edge, right at the centre of the Neubauer chamber.
- 8) Release the plunger slowly watching how the liquid enters the chamber uniformly, being absorbed by capillarity. See Fig. 5
- 9) In case of the appearance of bubbles, or that the glass cover has moved, repeat the operation.

**STEP 3. Microscope set up and focus.**

1. Place the Neubauer chamber on the microscope stage. If the microscope has a fixing clamp, fix the Neubauer chamber.
2. Turn on the microscope light.
3. Focus the microscope until you can see a sharp image of the cells looking through the eyepiece and adjusting the stage.
4. Look for the first counting grid square where the cell count will start. In this example, 5 big squares from a Neubauer-Improved chamber will be counted. See Fig. 6

See <http://www.celeromics.com/easy-formula-for-manual-cell-counting.htm>, for the formulas to be applied for the most common counting chamber (Thoma, Fuchs-Rosenthal, Nageotte, etc)

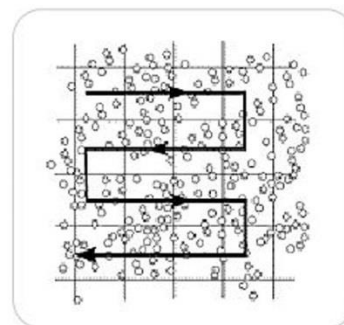
5. Start counting the cells in the first square.

Different laboratories have different counting protocols, but there is a popular unwritten rule that states:

"Cells touching the upper and left limits should be counted, unlike cells touching the lower and right limits which should not be taken into account"

In case of high cell concentration, it will become very easy to get lost when counting cells. In this case, a counting technique in zig-zag is used.

6. Write down the amount of cells counted in the first square.
7. Repeat the process for the remaining squares, writing down the counting results from all of them. The higher the number of cells counted, the higher the accuracy of the measurement.



Slika 24. Protokoli postavljanja uzorka u Neubauer komoricu, te mikroskopiranja i brojanja

Figure 24. Protocols for introducing the sample on the Neubauer chamber and microscoping and counting

Kalkulacija koncentracije izračunavala se prema formuli: koncentracija (spora/ml) = broj spora/volumen (ml), gdje je broj spora zbroj ukupnog broja spora u svim poljima zajedno, a volumen je zbroj svih volumena polja zajedno. Dimenzije velikih kvadrata su 0.1 cm x 0.1 cm, a dubina komore 0.1 mm (0.01 cm), formula za volumen je 0.1 cm x 0.1 cm x 0.01 cm = 0.0001 cm<sup>3</sup> (0.0001 ml = 0.1  $\mu$ l) što nas dovodi do upotrebljavane konačne formule za izračunavanje volumena velikih kvadrata: koncentracija (spore/ml) = (broj spora x 10000) / brojem kvadrata. Ukoliko se otopinu uzorka prije razrijeđivala tada se koncentracija dijelila s razrijeđenjem koje se apliciralo na otopinu.



### **2.2.7. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata patogena *Hymenoscyphus fraxineus***

#### **Djelovanje Allicina na rast izolata**

Testirana je djelotvornost komercijalnog pripravka Conquer koji sadrži aktivnu tvar Allicin ( $C_6H_{10}OS_2$ ) proizvođača JCA Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo Velike Britanije i sjeverne Irske. Allicin se proizvodi iz prirodnog biljnog materijala češnjaka (*Allium sativum* L.) koji je posebno uzgajan pod uvjetima i standardima Europske dobre agrikulturne prakse (eng. *GAP - Good Agricultural Practice*) propisane EUREPGAP organizacijom. Proizvodi se bez upotrebe kemikalija, u potpunosti je biorazgradiv, te je siguran za čovjeka i okoliš. Proizvodnja se strogo odvija prema BS i ISO standardima 9001:2000. Nadalje, testiran je u internacionalno priznatoj organizaciji TNO, Organizaciji za primjenu znanstvenog istraživanja (eng. *Organisation for Applied Scientific Research*), Nizozemska, čiji su rezultati pokazali da upotrebom pravilne koncentracije Allicin uništava vrstu bakterijskog patogena *Pseudomonas syringe* pv *aesculi*. Dodatna testiranja Botaničkog zavoda za bolesti u Nizozemskom Ministarstvu poljoprivrede (eng. *Botanic Disease Department of the Dutch ministry of Agriculture, Nature and Food Quality in Wageningen*) potvrđuju te rezultate.

Sredstvo se isporučuje u koncentraciji 5000 ppm. Registrirano je pod zaštićenim imenom Conquer™ te ima licencu za upotrebu u eksperimentalnom istraživanju za tvrtku JCA Limited. JCA Limited je glavni svjetski distributer Conquer™ sredstva, ali je i član spin-off kompanije De Rebus Plantarum Sveučilišta u Padovi, koja ima pravo distribucije sredstva na području Jugoistočne Europe i Sjeverne Afrike. Od spin-off kompanije De Rebus Plantarum Sveučilišta u Padovi nabavljen je uzorak Conquer™ sredstva za eksperimentalnu upotrebu.

Svrha testiranja je usporedba učinkovitosti Allicina kao biološkog sredstva suzbijanja, te njegove eventualne mogućnosti upotrebe u zaštiti stabala u urbanim sredinama. U pokusu je testirano šest različitih izolata patogena *H. fraxineus* od kojih su tri izolata bila s mitovirusom HfMV1 (*Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 1), a tri bez mitovirusa (Tablica 6).

Tablica 6. Odabrani izolati patogena *H. fraxineus* za testiranje djelotvornosti Allicin sredstva zaštite

Table 6. Pathogen *H. fraxineus* isolates chosen for testing effectiveness of Allicine agent in disease protection

Broj izolata	Izolat / Lokacija	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	Nadmorska visina	Tip idiomorfa	Virus HfMV1
1	Vrbanjske šume 91B.1 V0M1	45.034364	18.980042	80	1	0
2	Ivanščica L3 V0M1	46.182698	16.126570	1024	1	0
3	Brinje L3 V0M1	45.001524	15.251416	617	1	0
4	Čazma K23 V1M1	45.753378	16.582857	102	1	1
5	Nova Gradiška K1 V1M1	45.252200	17.361963	112	1	1
6	Zalesina L3.2. V1M1	45.383509	14.873481	781	1	1

Legenda: *Fraxinus angustifolia*; *Fraxinus excelsior*

U pokusu za svaku repliku uzorka upotrebljena je količina od 1 ml otopine razrijeđenog Allicina. Koncentrirani Allicin od 5000 ppm (0.5 %) razrijeđen je na 0.1825 % što znači da se za Allicin upotrebljavala koncentracija od 0.01 mol/dm<sup>3</sup>. Odabrana koncentracija od 0.01 mol/dm<sup>3</sup> određena je kao optimalna za sva testiranja s obzirom na ukupnu količinu raspoloživog sredstva.

Sredstvo je na izolate aplicirano na dva načina u dva odvojena testiranja. Prvo testiranje zahtjevalo je prethodni uzgoj izolata na MEA mediumu pri temperaturi od 20 °C u trajanju od 7 dana, tako da izolati dosegnu određene veličine micelija, te da se dobro etabliraju u mediumu. Nakon toga se pipetama unutar sterilnog laminarija u svaku petrijevku zasebno dodavala otopina s unaprijed pripremljenom koncentracijom sredstva. Petrijevke su nakon toga zapečaćene PARAFILM® (SIGMA – ALDRICH CHEMIE, GmbH) trakom, vraćene natrag u termokomoru na temperaturu od 20 °C bez utjecaja svjetla na daljnji rast.

Drugo testiranje zahtjevalo je da se pri pripremi MEA mediuma direktno dodaje otopina sredstva, na takav način da se preračunao volumen Allicina (40 ml) koji se dodavao u agar medium prema broju nastalih petrijevki (40) od 1L agar mediuma. Temperatura agar mediuma prije dodavanja alternativnih sredstava bila je 43 °C, na samoj granici početka krućenja. Smjesa tekućeg agar mediuma volumena 1 L se točno rasporedila na 40 petrijevih zdjelica, što znači da je količina sredstva primjene ostala ista od 1 ml po petrijevcu. Na tako pripremljene petrijevke nakon hlađenja postavljani su agar čepići s micelijem odabranih izolata, petrijevke su zapečaćene PARAFILM® trakama, te postavljene u termokomoru na temperaturu od 20 °C bez utjecaja svjetla. Svaka replika izolata tj. svaka petrijevka je

pregledana dva puta tjedno u pravilnim razmacima, te je izmjeren rast izolata u četiri različita smjera (gore, dolje, lijevo, desno) od centralnog presađenog čepića s kulturom gljive. Rast se mjerio u milimetrima (mm), a vrijednost rasta izolata između dva mjerenja dobivena je razlikom vrijednosti između dva susjedna mjerenja. Na taj način mogli smo detaljno pratiti fluktuacije ili kontinuitet stope rasta iako su uvjeti bili nepromijenjeni.

### **Djelovanje Allicina na fruktifikaciju izolata**

Nakon primjene Allicina na rast izolata gljive *H. fraxineus* svaka se replika izolata posebno dodatno testirala na kvantifikaciju fruktifikacije uz pomoć Neubauer komorice za brojanje spora (Hemocitometar) prema već opisanoj proceduri u poglavlju 2.2.6. Prije kvantificiranja fruktifikacije bez obzira na period praćenja rasta posebna pažnja posvetila se tome da starost izolata, do trenutka testiranja, bude vremenski period od točno mjesec dana, tako da svi testirani izolati budu jednake starosti.

Kulture stare točno četiri tjedna u različitim fazama rasta i razvoja, sukladno različitim djelovanjima sredstva, su uzimane kao referentne za određivanja utjecaja Allicina na sposobnost fruktificiranja izolata u usporedbi na vrijednosti fruktifikacije istih izolata na koje nije apliciran Allicin kao sredstvo zaštite. Kontrolni netretirani izolati rasli su u mraku pri temperaturi od 20 °C isti vremenski period kao i tretirani izolati.

## **2.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena *Hymenoscyphus fraxineus***

### **2.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena**

Istraživanja s umjetnim inokulacijama sadnica jasena provodilo se isključivo na zdravim vitalnim sadnicama, prethodno detaljno pregledanim više puta uzastopno u razmacima od nekoliko mjeseci, bez simptoma pojave bolesti. Sadnice su se prethodno pripremale za proces inokulacije redovnom presadnjom u veće kontejnere minimalno godinu dana prije inokulacije zbog dobre adaptacije sadnice i eliminiranja utjecaja stresa presadnje na biljku. Presadnjom u veće kontejnere osiguravalo se izbjegavanje negativnog utjecaja skučenosti korijena ili neadekvatne nutritivne opskrbe biljke tijekom procesa praćenja na razvoj simptoma bolesti (nekrotičnih lezija u kori). Sve biljke upotrebljavane u inokulacijskim testovima klasirane su da budu podjednake veličine i jednake starosti, te su postavljene u iste uvjete svjetlosti, vode,

prihrane, dostupnosti hraniva (obujma kontejnera) i slično. Sadnice su izložene djelovanju prirodnih klimatskih uvjeta zbog bolje okolišne adaptacije biljaka.

Testovi patogenosti su testovi koji nam pokazuju ukoliko neki soj određene vrste gljive ima ili nema parazitsku sposobnost infekcije određene vrste domaćina, te da li ima sposobnost destruktivnog razaranja biljnog tkiva domaćina koji dovodi do smrti biljke ili je biljka sposobna othrvati se djelovanju patogena. Testovi patogenosti započinju inokulacijskim procesom.

Prije inokulacijskog procesa uzgojeni su i pripremljeni čepići agar mediuma s micelijem *C. fraxinea* koji su se koristili za inokulaciju sadnica. Prethodno su uzgojeni svježiji miceliji starosti četiri do šest tjedana koji u tom periodu imaju optimum aktivnosti svog rasta. Instrumenti korišteni za ovu pripremu su mikrobiološka igla (eža), skalpel i petrijevke. Eža i skalpel sterilizirani su 96% etanolom i plamenom, a petrijevke su izložene djelovanju UVC antimikrobnom svjetlu u trajanju od 10 min. Iz takvih petrijevki s pripremljenim kulturama laboratorijskom ezom izrezani su čepići agara s micelijem promjera 5 mm jedne čiste kulture odnosno točno određene replike istog soja. Ti su čepići uz pomoć skalpela postavljeni u sterilnu novu petrijevku zapečaćenu Parafilm® trakom, te se petrijevka položila u prethodno rashlađeni prijenosni frižider s ledom koji smo ponijeli na terensku inokulaciju. Ukoliko smo za testove inokulacije imali više različitih sojeva (izolata) tada smo izolate odvajali u zasebne petrijevke i svaku posebno obilježavali, stoga su naša (minimalno dva) korištena izolata postavljana u zasebne petrijevke. Agar medium čepići za kontrolu napravljeni su po istoj metodi u duljini promjera 0.5 mm, međutim oni nisu sadržavali micelij niti jedne gljive već samo sterilni agar medium. Čepići za kontrolu su također postavljeni u zasebnu izoliranu petrijevku.

Kod inokulacije biljaka korišten je 96 % etilni alkohol (etanol  $C_2H_5OH$ ) i prijenosni plamenik (brener) za sterilizaciju skalpela, pinceta i kružnog instrumenta za urezivanje rupa promjera 5 mm koje smo koristili kao alate za obavljanje inokulacije. Laboratorijske lateks rukavice kao zaštita na rukama uz prethodno pranje ruku sapunom, ispiranje vodom i etanolom (70 %) koristilo se obavezno prije svakog procesa inokulacije. Sav korišteni pribor steriliziran je 96 % etanolom i plamenikom prije početka upotrebe. Početak procesa inokulacije započeo je sterilizacijom površine kore 96 % etanolom i brisanjem vatenim jastučićima  $\pm 5$  cm od mjesta na kojem se planirala raditi ulazna rana. Ulazna rana (mjesto inokulacije) napravljena je na stabljici biljke 20 cm iznad razine tla. Sterilizacija kore se provodila najmanje dva ili više puta dok se sve nečistoće s kore potpuno nisu uklonile. Zatim je sterilnim kružnim instrumentom

promjera 5 mm urezana rana do dubine kambijskog sloja istih dimenzija kao i prethodno pripremljeni agar čepić (5 mm). Sterilnom pincetom ili skalpelom uzet je agar čepić s micelijem i položen u ranu na biljci tako da micelij dodiruje unutrašnji dio rane (izložene stanice drva). Rana s čepićem zatvorena je Parafilm® trakom omotavanjem oko stabljike na mjestu inokulacije da se spriječi vanjska kontaminacija i isušivanje. Također, rana se dodatno iznad Parafilm® trake zamatala aluminijskom folijom radi sprječavanja prodora svjetla, radi dodatne vanjske zaštite od kukaca i ptica, zaštite od sunca i kiše, ali i zbog bolje simulacije uvjeta u kojima gljiva optimalno funkcionira, a to je mrak u unutrašnjim tkivima domaćina.

Ovakve inokulacije pomoću umjetnih rana na kori stabala, u testovima patogenosti su standardan postupak testiranja patogenosti gljivičnih vrsta (Kowalski & Holdenrieder 2009a; Krautler & Kirisits 2012; Dal Maso et al. 2012; Krautler et al. 2015). Rane se pregledavalo u pravilnim intervalima otvaranjem, izmjerom rasta duljine nekroza “prema gore” i “prema dolje” od mjesta inokulacije odnosno od gornjeg i donjeg ruba inducirane rane. Nakon izmjere rane su ponovno kao i u procesu inokulacije zatvarane Parafilm® trakom i aluminijskom folijom. Na kraju testova patogenosti svi su uzorci nekroza ponovno testirani i reizoliran je patogen iz nekroza kao potvrda infekcije *H. fraxineus* gljivičnim patogenom, čime se potvrdio zadnji od četiri uvjeta Kochova postulata za znanstveno utvrđivanje uzrokuje li specifični mikroorganizam specifičnu bolest.

#### **2.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza**

Testirali smo mogućnost utjecaja temperature na inficirane sadnice *F. excelsior* u dva različita umjetno simulirana uvjeta s različitim temperaturnim režimom. Prvi režim postavljen je u laboratorijskim kontroliranim uvjetima s konstantnom temperaturom  $23 \pm 1$  °C, dok je drugi režim postavljen pri utjecaju vanjske temperature zraka u prirodnim uvjetima u vremenskom razdoblju od 04.07.2014. – 05.09.2014. godine. Prvi pokus u kontroliranim uvjetima temperature postavljen je u Laboratoriju za patologiju drveća Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, dok je pokus u prirodnim uvjetima temperaturnog režima postavljen u Arboretumu Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod zastorom krošanja starijih stabala, kao zaštita od direktnog utjecaja sunčeve svjetlosti u ljetnim mjesecima.

Za pokus je odabrano 10 biljaka (7 inokuliranih + 3 kontrolne sadnice) prema shemi (*F. excelsior* 7 sadnica inokuliranih izolatom1 + 3 kontrolne sadnice : *F. excelsior* 7 sadnica inokuliranih izolatom1 + 3 kontrolne sadnice). Inokulirane su sadnice običnog jasena starosti četiri godine prethodno dobivene iz prirodnih sastojina na području Parka prirode

Medvednica iz dijela Nastavno pokusnog šumskog objekta Zagreb – Sljeme. Sadnice su presađene u veće kontejnere godinu dana prije inokulacijskog procesa. Izolat1 patogena *H. fraxineus* upotrijebljen za inokulaciju dobiven je izolacijom s lokacije prvog nalaza *H. fraxineus* u Republici Hrvatskoj na *F. excelsior* Gorski kotar, iz područja Nastavno pokusnog šumskog objekta Zalesina (G.J. Belevine), Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izolat 1 dobiven je s mikrolokacije koordinata 45.383858° S, 14.873822° I, izolacijom patogena iz soliternog stabla *F. excelsior* s vidljivim simptomima bolesti, promjera 20 cm i visine 18 m, iz uzorka drvnog tkiva poprečnog presjeka debla približno na jedan metar visine od razine tla.

Inokulacija biljaka odvijala se prema opisanom procesu inokulacije u poglavlju (2.3.1.).

Uz 10 biljaka u svakom testiranju postavljene su i iButton® DS1923 (Maxim Integrated™) mjerne jedinice za mjerenje temperature zraka i relativne vlage zraka. Nekroze su mjerene svakih 7 dana u vremenskom periodu od 8 tjedana.

#### **2.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza**

Testirali smo mogućnost utjecaja domaćina, dvije autohtone vrste jasena (*F. excelsior* i *F. angustifolia*) koje u prirodnim uvjetima u Hrvatskoj pokazuju znakove zaraze patogenom *H. fraxineus*, na rast patogena i tvorbu nekroza. Pokus je postavljen u laboratorijskim kontroliranim uvjetima s konstantnom temperaturom  $23 \pm 1$  °C u vremenskom razdoblju trajanja od osam tjedana praćenja, u Laboratoriju za patologiju drveća Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Testirano je 10 biljaka svake pojedine vrste jasena inficirane s dva različita izolata *H. fraxineus* + 5 kontrolnih biljaka za svaku vrstu domaćina. Prema shemi (*F. excelsior* 10 sadnica inokuliranih izolatom1 + 10 sadnica inokuliranih izolatom2 + 5 kontrolnih sadnica : *F. angustifolia* 10 sadnica inokuliranih izolatom1 + 10 sadnica inokuliranih izolatom2 + 5 kontrolnih sadnica).

Sadnice običnog jasena starosti četiri godine potječu iz područja Parka prirode Medvednica (prethodno opisano u poglavlju 2.3.1.1.). Dok sadnice poljskoj jasena starosti 3 godine potječu iz rasadnika “Cernik” Hrvatske šume d.o.o., sadnice su dobivene sjetvom sjemena iz sjemenske regije srednje Posavine (sjemenska regija 1.2.2.) (Pravilnik o provenijencijama svojti šumskog drveća Narodne novine NN 147/2011; Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o provenijencijama svojti šumskog drveća Narodne novine NN 96/2012). Sadnice obje vrste domaćina presađene su u veće kontejnere godinu dana prije procesa inokulacije.

Izolati 1 i 2 patogena *H. fraxineus* upotrijebljeni za inokulaciju dobiveni su izolacijom s lokacije prvog nalaza *H. fraxineus* u Republici Hrvatskoj na običnom jasenu u Gorskom kotaru, iz područja Nastavno pokusnog šumskog objekta Zalesina (G.J. Belevine), Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izolat 1 dobiven je s mikrolokacije koordinata 45.383858° S, 14.873822° I, izolacijom patogena iz soliternog stabla *F. excelsior* s vidljivim simptomima bolesti, promjera 20 cm i visine 18 m, iz uzorka drvnog tkiva poprečnog presjeka debla približno na jedan metar visine od razine tla. Izolat 2 dobiven je s mikrolokacije koordinata 45.385710° S, 14.872510° I, izolacijom patogena iz soliternog mladog stabla *F. excelsior* s vidljivim simptomima bolesti, promjera 4 cm i visine 3 m, iz uzorka izbojaka u krošnji s vidljivim nekrozama, te je uzorak tkiva za samu izolaciju uzet iz drvnog tkiva odmah ispod sloja kore. Uzorak izbojka uzet je s približno dva metra visine od razine tla.

Inokulacija biljaka odvijala se prema opisanom procesu inokulacije u poglavlju (2.3.1.).

Biljke su praćene i mjerene su producirane duljine nekrotičnih lezije u pravilnim razmacima od 15 dana u vremenskom periodu od osam tjedana.

### **2.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena**

Provedeno je istraživanje osjetljivosti klonova poljskog jasena na patogena *H. fraxineus* kako bi se utvrdila eventualna pojava smanjene osjetljivosti odnosno rezistentnosti domaćina na patogena. Selekcija manje osjetljivih jedinki od iznimne je važnosti za održavanje i preživljavanje jasena u budućnosti, budući da patogen ugrožava opstanak cijelog roda *Fraxinus*, a posebice običnog i poljskog jasena u Hrvatskoj. Testiranje se provodilo u razdoblju motrenja od 140 dana od trenutka inokulacije, te nakon jedne godine postinokulacijskog procesa izvršeno je motrenje procjene stope preživljavanja sadnica poljskog jasena.

Devet klonova poljskog jasena koji potječu iz dvije klonske sjemenske plantaže, odabrani su za testiranje osjetljivosti na invazivnu patogenu gljivičnu vrstu *H. fraxineus*. Klonovi poljskog jasena potječu iz dvije klonske sjemenske plantaže poljskog jasena (Nova Gradiška i Čazma) od kojih svaka predstavlja jednu od dvije najvažnije provinijencijske sjemenske regije poljskog jasena u Hrvatskoj. Prva klonska sjemenska plantaža poljskog jasena Nova Gradiška (HR FAN SP 122/301) osnovana 2005. godine na površini od 3.5 ha s ukupno 56 različitih klonova predstavlja sjemensku regiju srednje Posavine 1.2.2., dok druga klonska sjemenska plantaža poljskog jasena Čazma (HR FAN SP 123/298) osnovana 2007. godine na površini od 7.3 ha s ukupno 50 različitih klonova predstavlja sjemensku regiju gornje Posavine srednje



Hrvatske i Pokuplja 1.2.3. (Pravilnik o provenijencijama svojti šumskog drveća Narodne novine NN 147/2011; Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o provenijencijama svojti šumskog drveća Narodne novine NN 96/2012). Ukupno devet klonova je upotrijebljeno u istraživanju od čega su četiri klona predstavljala sjemensku regiju srednje Posavine 1.2.2. (klonovi NG03, NG31, NG41 i NG55) i pet klonova koji predstavljaju sjemensku regiju gornje Posavine srednje Hrvatske i Pokuplja 1.2.3. (klonovi BJ25, BJ28, BJ32, BJ35 i BJ38). Sadnice klonova su dobivene cijepljenjem reznica (plemke) klonova iz klonskih sjemenskih plantaža poljskog jasena na jednogodišnju podlogu dobivenu iz sjemena prirodnih sastojina poljskog jasena nepoznatog genotipa. Sadnice su proizvedene u rasadniku "Hajderovac" Hrvatske šume d.o.o., te su u trenutku inokulacije bile starosti tri godine. Sadnice su godinu dana prije procesa inokulacije presađene u veće kontejnere zapremnine 7.5 L. Testovi patogenosti i proces inokulacije klonova obavljeni su u Arboretumu Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Svaki od pet klonova koji potječu iz klonske sjemenske plantaže poljskog jasena Čazma, bili su zastupljeni s po 15 rameta, dok su četiri klona iz klonske sjemenske plantaže poljskog jasena Nova Gradiška bila zastupljena s 9 rameta svakog klona, što ukupno iznosi 111 inokuliranih biljaka. Svaki od dva izolata *H. fraxineus* je upotrijebljen za inokulaciju pet rameta svakog klona koji potječe iz klonske plantaže Čazma ostavljajući tako pet rameta za kontrolnu skupinu. Prema shemi (5 izolat1 + 5 izolat2 + 5 kontrola). Procedura se ponavljala za klonove koji potječu iz klonske sjemenske plantaže Nova Gradiška s razlikom inokuliranja tri ramete svakog klona s svakim pojedinim izolatom i ostavivši tako tri ramete za kontrolnu skupinu. Prema shemi (3 izolat1 + 3 izolat2 + 3 kontrola).

Nakon selekcije i pripreme klonova izvedena je inokulacija klonova prema već opisanoj metodi u poglavlju 2.3.1. kako bi se pratio rast patogena mjerenjem duljine induciranih nekrotičnih lezija na biljnim stabljikama tijekom određenog vremenskog perioda. Čepići s micelijem za inokulaciju sadnica su u prethodno opisanom inokulacijskom procesu izrezani s ruba četiri tjedna starih *H. fraxineus* kultura koje su rasle na agar mediumu PDA (Difco™ No. 213400) na temperaturi od  $20 \pm 0.5$  °C. Inokulacija klonova obavljena je s dva izolata patogena izoliranih u proljeće 2014. godine. Izolati 1 i 2 patogena *H. fraxineus* upotrijebljeni za inokulaciju dobiveni su izolacijom s lokacije prvog nalaza *H. fraxineus* u Republici Hrvatskoj na običnom jasenu u Gorskom kotaru, iz područja Nastavno pokusnog šumskog objekta Zalesina (G.J. Belevine), Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Detalji o podrijetlu izolata već su opisani u poglavlju 2.3.1.2. Kontrolne biljke inokulirane su sterilnim

čepićima agar mediuma PDA (Difco™ No. 213400) promjera 5 mm, slijedeći istu proceduru kao i kod inokulacije s izolatima gljive. Ramete su inokulirane 30.09.2014. i izmjereni su promjeri stabljika na mjestu izolacije. Sadnice su pregledavane i mjerene su duljine nekroza svakih 15 dana u periodu od 14.10.2014. – 17.02.2015, tj. u vremenskom periodu od 140 dana od trenutka inokulacije. Biljke su pregledane i 22.09.2015., tj. godinu dana nakon postupka inokulacije da bi se utvrdila jednogodišnja progresija bolesti i utvrdila stopa preživljavanja eksperimentalnih biljaka.

### **2.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena**

Nakon uspješne infekcije klonova poljskog jasena za testiranje osjetljivosti klonova na djelovanje patogena *H. fraxineus*, opisanim u poglavlju 2.3.1.3., rađene su kemijske analize lišća svake pojedine ramete pripadajućeg klona da se utvrde eventualne razlike u stanju ishrane pod djelovanjem patogena, te rasvijetle međuodnosi domaćin – patogen. Uzorkovanje i kemijska analiza lišća rađene su da se dobije bolji uvid u djelovanje patogena na metabolizam domaćina, da se kvantificiraju štete koje prouzrokuje poremećaj metabolizma domaćina promjenom koncentracije biogenih elemenata u tkivima domaćina, da se uspoređi razlika u patogenosti izolata uz pomoć razlike u koncentraciji biogenih elemenata, te da se utvrdi ima li signifikantne razlike između koncentracije biogenih elemenata u lišću nezaraženih i zaraženih biljaka uzgajanih u istim uvjetima.

Nakon devet mjeseci infekcijskog procesa, uzorkovano je lišće bez vidljivih simptoma bolesti sa svake ramete pripadajućeg klona zasebno uz pomoć lateks rukavica da ne dođe do kontaminacije lišća nekim metalima ili drugim kemijskim spojevima i njihovim reziduama. Ukoliko je iznad mjesta inokulacije krošnja bila vitalna, sakupljao se jedinstveni uzorak kompletne krošnje, a ukoliko je iznad mjesta inokulacije biljka bila mrtva sakupljao se jedinstveni uzorak iz postranih živih izbojaka. Lišće je stavljano u sterilne plastične vrećice, posebno obilježene i zapečaćene.

#### **2.3.2.1. Određivanje koncentracije elemenata tehnikom ICP-AES**

Uzorci lišća preneseni su u laboratorij na sušenje u zasebnim plastičnim posudama u sušionik (BT 80 L INKOLAB) pri temperaturi od 60 °C u vremenskom periodu od 48 h do konstantne mase. Zatim se uzorke lisnog tkiva ručno usitnjavalo uz korištenje lateks rukavica u pripadajućim plastičnim zdjelicama. Uzorak se zatim prenosio u eppendorf tube sa safety lock mehanizmom gdje su dodane metalne kuglice za homogenizaciju tkiva. Tube su uranjane u tekući dušik (N<sub>2</sub>) na -196 °C, te tako smrznuti uzorci postavljani na TissueLyzer II (Retsch®

QIAGEN®) koji je tada uz pomoć metalnih kuglica unutar eppendorf tuba homogenizirao uzorke tkiva do razine vrlo sitnog suhog praška. Takvi uzorci pripremljeni su za daljnju proceduru kemijske analize uzoraka biljnog materijala.

Određivanje koncentracije elemenata tehnikom ICP-AES (atomske emisijske spektrometrije) odrađeno je u skladu s publikacijom (Babić et al. 2009). Svaki uzorak (~0,1 g) razoren je metodom mokre digestije u 6 mL koncentrirane dušične kiseline ( $\text{HNO}_3$ , *p.a.*, „Carlo Erba“, Italija) u mikrovalnom sustavu za razaranje uzoraka Anton Paar Multiwave 3000 opremljenom rotorom XFS-100 i teflonskim posudama volumena 100 mL. Parametri digestije primijenjeni na mikrovalnom sustavu bili su:  $P_{\max} = 1200 \text{ W}$ ;  $t_{\max} = 200 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $p_{\max} = 60 \text{ bar}$ ;  $\tau(\text{postupno zagrijavanje}) = 10 \text{ min}$ ,  $\tau(\text{zagrijavanje pri maksimalnim } t, p) = 15 \text{ min}$ ,  $\tau(\text{hlađenje}) = 20 \text{ min}$ . Nakon provedene digestije, dobivene otopine su u polipropilenskim odmjernim tikvicama od 100 mL („Nalgene“) razrijeđene ultračistom vodom. Takve otopine su analizirane tehnikom ICP-AES. Zajedno sa svakom serijom od 7 uzoraka, tretirana je po jedna slijepa proba dušičnom kiselinom ( $\text{HNO}_3$ , 1 %, v/v).

Određivanje sadržaja metala u priređenim uzorcima izvedeno je ICP-AES tehnikom uz induktivno spregnutu plazmu. Uređaj je podešen na stabilne uvjete rada te je obavljena vanjska kalibracija serijom standardnih otopina priređenih razrjeđivanjem komercijalnog multielementnog standarda (Multi-element ICP-Standard-Solution ROTI®STAR, Carl Roth GmbH & Co., Njemačka). Za elemente Na, K, Mg i Ca korištena je komercijalna standardna otopina (Multielement standard solution III for ICP, TraceCERT® (Fluka), Sigma-Aldrich, Njemačka), koja je razrijeđena 1000 puta.

Sve standardne otopine i slijepa proba zakiseljene su dušičnom kiselinom ( $\text{HNO}_3$ , 1 %, v/v). U tablici su dani važni parametri instrumentne analize (Tablica 39).

Određivanje udjela organskog i ukupnog ugljika odrađen je u skladu s normom (ISO 10694) i ukupnog dušika s normom (ISO 13878) suhim spaljivanjem na uređaju CHNS/O Flash 112 (Thermo Scientific™). Odvagnuti uzorak organske tvari iznosio je do 50 mg.

U uzorcima su određene koncentracije sljedećih elemenata: dušik, kalij, ugljik, kalcij, magnezij, željezo, cink, mangan, bor, aluminijski, barij, krom, molibden, natrij, stroncij i titanij (Slika 92; Slika 93; Slika 94; Slika 95). Detaljno su obrađeni i statistički obrađene vrijednosti biogenih elemenata koji su važni u metabolizmu biljke i za koje je poznata uloga u biljci, a to su: dušik, kalij, ugljik, kalcij, magnezij, željezo, cink, mangan i bor.

### 2.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena

U dvije klonske sjemenske plantaže koje predstavljaju dvije najvažnije provenijencije sjemenskih regija poljskog jasena u Hrvatskoj (opisane u poglavlju 2.3.1.3.) praćena je fenologija listanja jasena u periodu od 2012. – 2015. godine, te fenologija odbacivanja (otpadanja) lista u jesen. Fenologija listanja praćena je u pravilnim vremenskim razmacima od sedam dana od početka godine do ulaska klonova u završnu fazu listanja. Fenologija odbacivanja lista praćena je u jednom optimalnom trenutku najveće varijabilnosti odnosno zastupljenosti klonova kroz sve faze motrenja odbacivanja lista u jesen.

Fenologija listanja i odbacivanja lista su svojstva koje su genetski uvjetovana i vrlo su stabilna u različitim ekološkim uvjetima (Hannerz 1998; Stener 2013), što ih čini pogodnim za istraživanja i klasiranja genotipa individualnih klonova. Prema tome razvijena je modificirana metoda opažanja fenofaza listanja sukladno istraživanju (Bogdan 2006; Bogdan et al. 2007; Andrić et al. 2016), te njeno klasiranje u šest razvojnih fenoloških faza (Slika 25), kao i modificirana metoda jesenske fenologije odbacivanja lista s drugačijim klasifikacijama sukladno istraživanju (Stener 2013) (Slika 26).

#### **Za fenofaze listanja u proljeće korištena je slijedeća klasifikacija:**

Faza 1: Spavajući pup koji je tvrd i sitniji od cvjetnog pupa

Faza 2: Faza bubrenja, pup veći (ne nužno), mekan, svjetlije smeđe do zelenkaste boje. Mogu se uočiti malo razmaknute ljuske pupa, ali se još uvijek ne vide vršci liski

Faza 3: Otvoreni pup, na vrhu pupa vide se razmaknute ljuske, te vršci liski (crvene ili zelene boje)

Faza 4: Vidljive skupljene liske, pri dnu se mogu još vidjeti otvorene ljuske pupa, boja još nije potpuno zelena (ukoliko je u FAZI 3 bio pup crvene boje)

Faza 5: List zelene boje, razdvajaju se liske, plojke liski nisu još potpuno otvorene

Faza 6: List potpuno razvijen iako još nije dosegao punu veličinu, plojke liski su potpuno ispravljene

**Za fenofaze odabacivanja lista u jesen korištena je slijedeća klasifikacija:**

Faza 0: List potpuno zelene boje, nije započelo jesensko otpadanje sa stabla

Faza 1: Početak žućenja lista, nije započelo jesensko otpadanje sa stabla

Faza 2: Početak opadanja lista s krošnje stabla

Faza 3: otpalo do 30 % lišća s krošnje stabla

Faza 4: otpalo od 30 – 60 % lišća s krošnje stabla

Faza 5: otpalo od 60 – 90 % lišća s krošnje stabla

Faza 6: otpalo preko 90 % lišća s krošnje stabla



Slika 25. Fenološke faze listanja u proljeće (modificirano prema Bogdan 2006, Andrić et al. 2016)

Figure 25. Phenological phases of spring leaf flushing (modified according to Bogdan 2006, Andrić et al. 2016)



Slika 26. Fenološke faze odbacivanja lista u jesen

Figure 26. Phenological phases of leaf shedding in autumn

Fenologija listanja omogućila je klasifikaciju odabranih klonova poljskog jasena u dvije osnovne forme, ranu i kasnu formu, što omogućuje izuzetnu praktičnu vrijednost ne samo za daljnje održavanje i upravljanje plantažama već i za produkciju kvalitetnog šumskog reproduktivnog materijala i njihovu distribuciju kao izuzetno važno adaptivno svojstvo za budućnost populacija. Omogućuje daljnju selekciju klonova koja zadržavaju svojstvo pasivne otpornosti prema patogenu *H. fraxineus* zbog kraćeg vegetacijskog razdoblja, a i daljnje testiranje klonova i testove potomstva na razne mogućnosti pojave genetičke rezistentnosti ili osjetljivosti na patogene.

#### 2.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena *Hymenoscyphus fraxineus*

Testirana je pojava hipovirulentnosti patogena *H. fraxineus* na sadnicama običnog i poljskog jasena inokulacijom sadnica odabranih izolata patogena s i bez virusa *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 1 (HfMV1). Vremenski period praćenja pokusa bio je 90 dana od trenutka inokulacije.



Sadnice običnog jasena porijeklom su iz prirodnih sastojina običnog jasena, područja Parka prirode Medvednica s lokacije Nastavno pokusnog šumskog objekta Zagreb – Sljeme, te su u trenutku inokulacije bile starosti 3 godine. Sadnice poljskog jasena potječu iz rasadnika “Cernik” Hrvatske šume d.o.o., sadnice su dobivene sjetvom sjemena iz sjemenske regije srednje Posavine (sjemenska regija 1.2.2.), te su u trenutku inokulacije bile starosti 3 godine. Sadnice obje vrste su presađene u veće kontejnere godinu dana prije inokulacijskog procesa.

U testiranje je postavljeno ukupno 100 sadnica, 50 sadnica biljaka *F. excelsior* i 50 sadnica *F. angustifolia*. Za svaki izolat upotrebljeno je 10 sadnica + 10 sadnica za kontrolnu skupinu. Prema shemi (10 sadnica Izolat Čazma K3 V0M2 + 10 sadnica Izolat Vrbovsko L1 V1M2 + 10 sadnica Izolat Flouriffoux 3I V0M2 + 10 sadnica Izolat Chevetogne 4II V1M2 + 10 kontrolnih sadnica). Inokulacijski postupak obavljen je prema već opisanoj metodi u poglavlju 2.3.1.

Za testiranje pojave hipovirulentnosti patogena odabrano je četiri izolata istog idiomorfa MAT2 (*mating type 2*). Odabirom izolata istog idiomorfa eliminirao se eventualni utjecaj idiomorfa na rast duljine nekroza. Dva izolata su podrijetlom Hrvatska, a dva Belgijska izolata. Unutar dva izolata istog podrijetla jedan pripada izolatu s virusom HfMV1, a drugi bez prisutnosti virusa HfMV1 u miceliju čiste kulture. Detalji odabranih izolata za testiranje hipovirulentnosti prikazani su (Tablica 7). Skupina kontrolnih sadnica inokulirana je sterilnim MEA (Oxoid™ CM0059) agar čepićima. Infektivni agar čepići su prethodno pripremljeni izrezivanjem iz četiri tjedna starih kultura izolata patogena uzgojenim na MEA (Oxoid™ CM0059) hranidbenoj podlozi.

Tablica 7. Odabrani izolati patogena *H. fraxineus* za testiranje hipovirulentnosti

Table 7. Pathogen *H. fraxineus* isolates chosen for hypovirulence testing

Broj izolata	Izolat / Lokacija	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	Nadmorska visina	HfMV1	Tip idiomorfa
1	Čazma K3 V0M2	45.752674	16.583326	102	0	2
2	Vrbovsko L1 V1M2	45.394888	15.050631	387	1	2
3	Flouriffoux 3I V0M2	50.463922	4.771629	177	0	2
4	Chevetogne 4II V1M2	50.236354	5.133941	255	1	2



Takvo testiranje omogućilo je praćenje razlike razvoja nekrotičnih lezija između različitih izolata s i bez prisutnosti virusa *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 1 (HfMV1), ali i utvrđivanje mogućih razlika u razvoju nekroza kod istih izolata između dva različita domaćina. Inokulacija sadnica je obavljena 04.04.2016. a nekroze su mjerene u razmacima od 30 dana sljedećih 90 dana do 04.07.2016. Izmjeren je i promjer stabljika na kraju testiranja da se utvrdi utjecaj patogena na debljinski rast sadnica običnog i poljskog jasena.

### **2.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva**

Nakon laboratorijskog testiranja Allicin sredstava zaštite bilja na pojedine izolate gljive direktnom primjenom na micelij gljive ili dodatkom u hranidbenu podlogu na kojoj se gljiva razvijala, bilo je potrebno odrediti praktičnu primjenu sredstva te mogućnosti aplikacije na terenu. Kao način primjene odabrana je direktna metoda injektiranja 1 ml pripremljene tekućine istog sredstva (Allicin) i iste koncentracije (0.1825 % ili 0.01 mol/dm<sup>3</sup>) kao što je upotrebljena u laboratorijskom testiranju.

Inokulirane sadnice poljskog jasena s razvijenim nekrotičnim lezijama upotrebljavane su nakon završetka testiranja hipovirulentnosti izolata patogena *H. fraxineus* opisanim u poglavlju 2.3.4. Opisi sadnica poljskog jasena, te njihovog porijekla i upotrijebljenih izolata patogena za produkciju nekroza također su navedeni u poglavlju 2.3.4., a opis metoda korištenih za inokulaciju u poglavlju 2.3.1. Ukupno je za testiranje *in vivo* pripremljeno 10 prethodno inokuliranih sadnica poljskog jasena inficiranih izolatom *H. fraxineus*, na kojima je inokulacija izvršena prije tri mjeseca te su bili vidljivi simptomi progresije bolesti i pojava nekrotičnih lezija. Sredstvo je injektirano u dozi od 1 µl uokolo postojeće nekroze. Kontrolne sadnice nisu tretirane već se njihov rast nekroza nastavio pratiti bez tretmana zaštite.

Za aplikaciju Allicin sredstva odabrana je laboratorijska šprica s mililitarskom podjelom i sterilnom iglom za ubrizgavanje. Sredstvo je ubrizgano uokolo proraslih tri mjeseca starih razvijenih nekrotičnih lezija. Praćen je daljnji rast i razvoj nekroza nakon ubrizgavanja sredstva u vremenskom periodu od četiri tjedna. Sadnice su se pregledavale svakih sedam dana i mjerio se rast nekroza na kori. Na kraju praćenja uzeti su uzorci tkiva iz područja nekrotičnih lezija da bi se pokušao proces reizolacije patogena, da se utvrdi preživljavanje patogena i njegovu daljnju aktivnost.

## **2.4. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka korišten je softverski paket IBM SPSS Statistics V22.0 (International Business Machines Corporation, Armonk, New York, USA). Za procjenu

veličine DNA fragmenata upotrijebljen je DNA fragment size calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/SizeCalc.html>, pristupljeno 17.2.2017.). Za analizu genetskih podataka i konstrukciju stabla prema taksonomskim (UPGMA) ili filogenetskim (Neighbor-joining) analizama, te provedbu univerzalnih reuzorkovanih tehnika (Bootstrapping 1000x) korišten je FreeTree softver (<https://web.natur.cuni.cz/~flegr/programs/freetree.htm>, pristupljeno 17.2.2017.) Za konstrukciju unrooted i filigram stabla korišten je TreeView V1.6.6. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, pristupljeno 17.2.2017.). Dio grafičkih prikaza izrađen je pomoću Microsoft Office 2013 alata (Redmond, WA, USA). Za izradu klimadijagrama korišten je online softver KLIMASOFT (<http://www.climatediagrams.net/>, pristupljeno 17.2.2017.). Za testiranje statističke signifikantnosti prilikom svih analiza korišten je stupanj značajnosti od 5% ( $p < 0.05$ ).

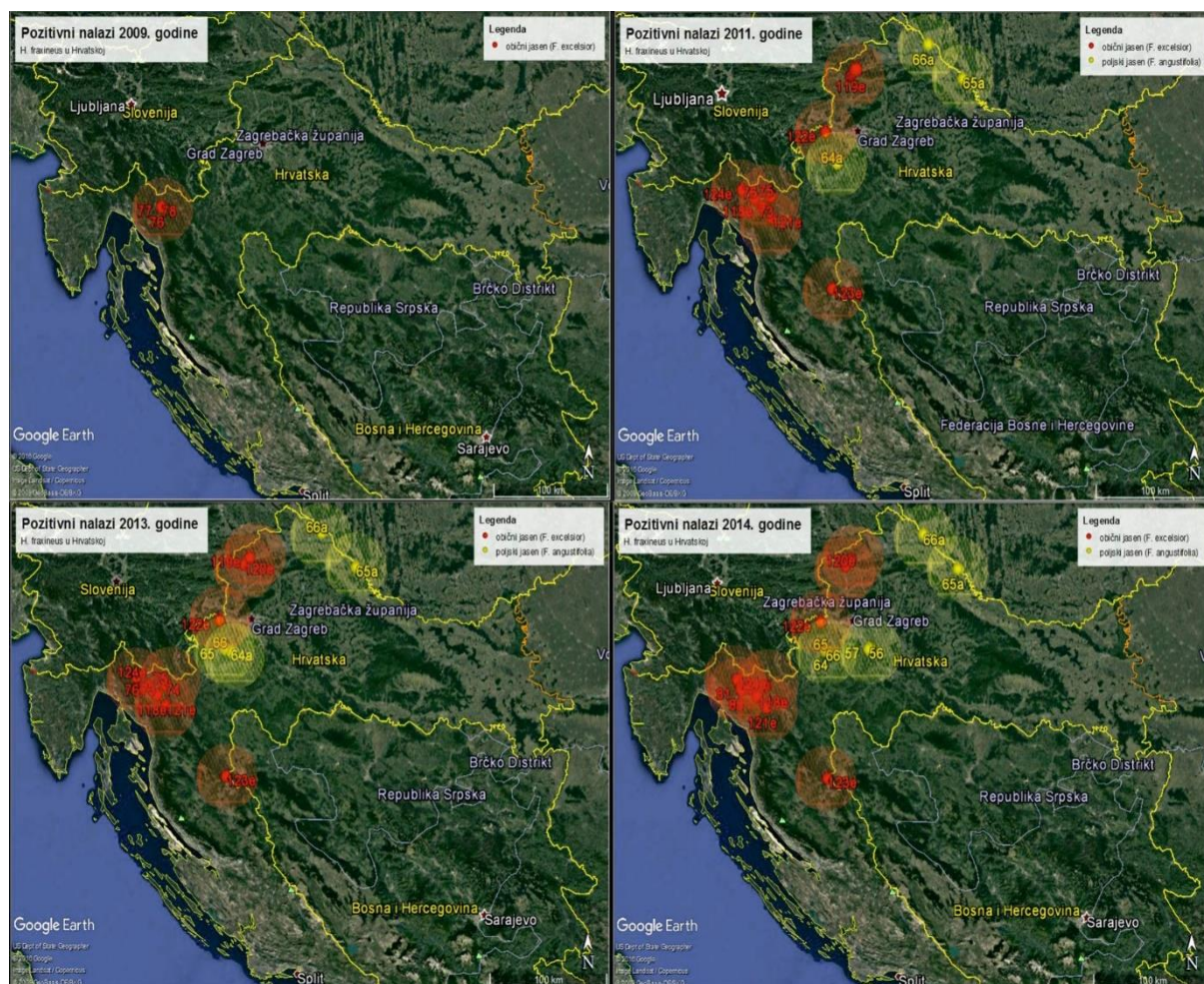
### 3. REZULTATI

#### 3.1. *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

##### 3.1.1. Rasprostranjenost i širenje patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

Rasprostranjenost gljivičnog patogena *H. fraxineus* u Hrvatskoj prikazana je s ukupno 97 potvrđenih pozitivnih lokacija i 15 negativnih lokacija na cijelokupnom prostoru areala *Fraxinus* spp. u Hrvatskoj. Na negativnim lokacijama kroz cijeli period motrenja (od 2009. – 2016. godine) nije potvrđena prisutnost gljive *H. fraxineus* u mediteranskom području (Slika 28). Na svakoj lokaciji uzorkovana su tri stabla što čini ukupan broj od 366 uzorkovanih stabala na arealu crnog, običnog i poljskog jasena koji se proteže od zapadne do istočne granice Republike Hrvatske, te čiji teritorij prolazi kroz 11 podružnica uprava šuma. Model širenja patogene gljive prikazan je kroz slike (Slika 27 i Slika 28) pozitivnih lokacija uzorkovanja u vremenskom periodu motrenja (od 2009. – 2016. godine), te kroz projekciju polumjera od 25 km koja predstavlja površinu provjerene prisutnosti patogena oko centralne točke uzorkovanja koja kroz period motrenja pojavom simptoma sušenja i izolacijom patogena potvrđuje kontinuiranu prisutnost gljive.

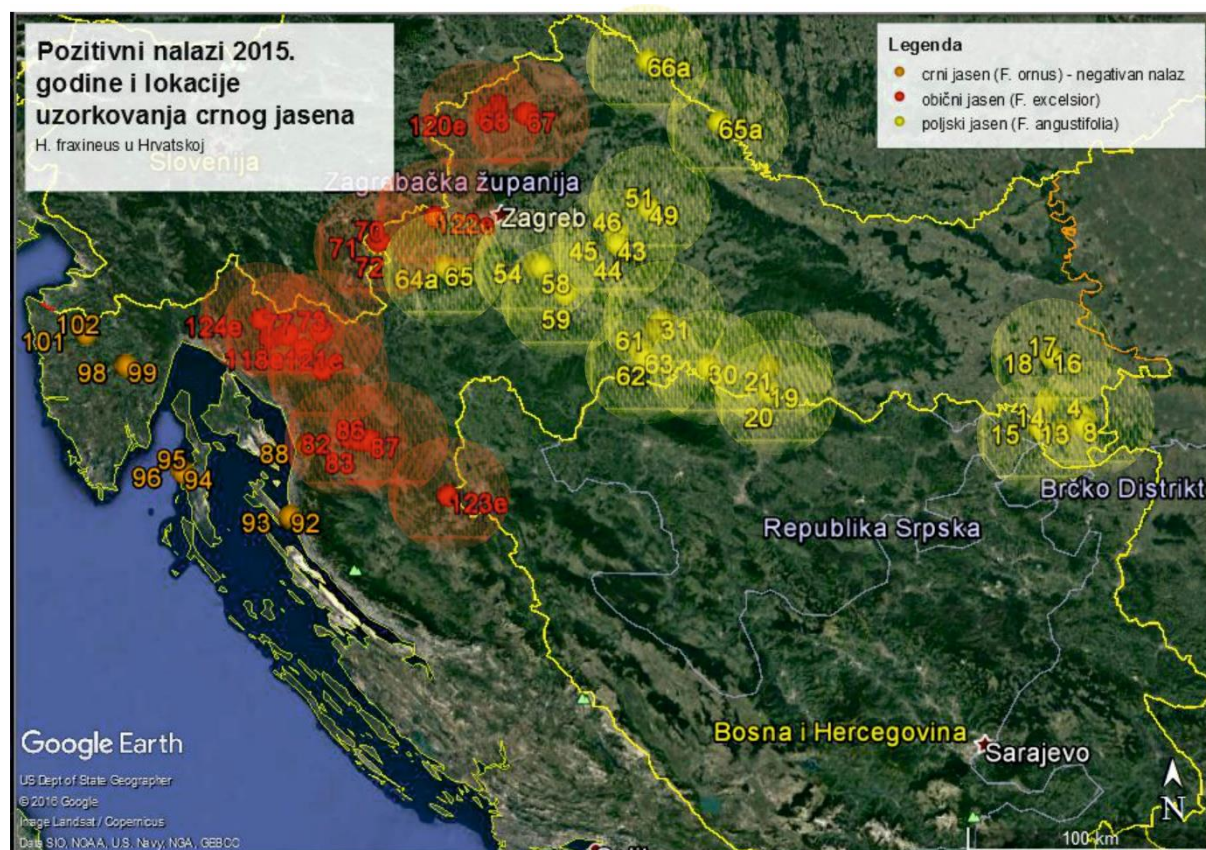
Prvi nalaz patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* s pripadajućim simptomima bolesti na običnom jasenu pronađen je na Nastavno pokusnom šumskom objektu Zalesina, Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2009. godine. Patogen se do kraja 2011. godine proširio na čitavo područje Gorskog kotara i Like, te se prvi puta pojavljuje na rubnim područjima dodira ekoloških niša običnog i poljskog jasena na poljskom jasenu u Pisarovinskim lugovima, Đurđevačkim nizinskim šumama i Donjem Međimurju. Isto tako do kraja 2011. godine patogen je potvrđen u rubnim graničnim područjima sa Slovenijom na običnom jasenu (G.J. Žumberak – Novoselska gora i G.J. Sjeverna Ivanščica). Do kraja 2014. godine patogen se nije značajno širio, te je obuhvatio samo novo zahvaćeno područje nizinskih šuma poljskog jasena u predjelu Turopoljskog luga (Slika 27). Do kraja 2015. godine patogen se značajno proširio na čitavo Posavsko nizinsko područje uz tok rijeke Save sve do krajnjih istočnih granica Hrvatske s Srbijom, te Bosnom i Hercegovinom (Slika 28).



Slika 27. Projekcija vremenskog širenja bolesti uzrokovane gljivom *H. fraxineus* u Hrvatskoj u periodu od 2009. – 2014. godine

Figure 27. Temporal projection of natural spread of the disease caused by the fungus *H. fraxineus* in Croatia in 2009 – 2014 period





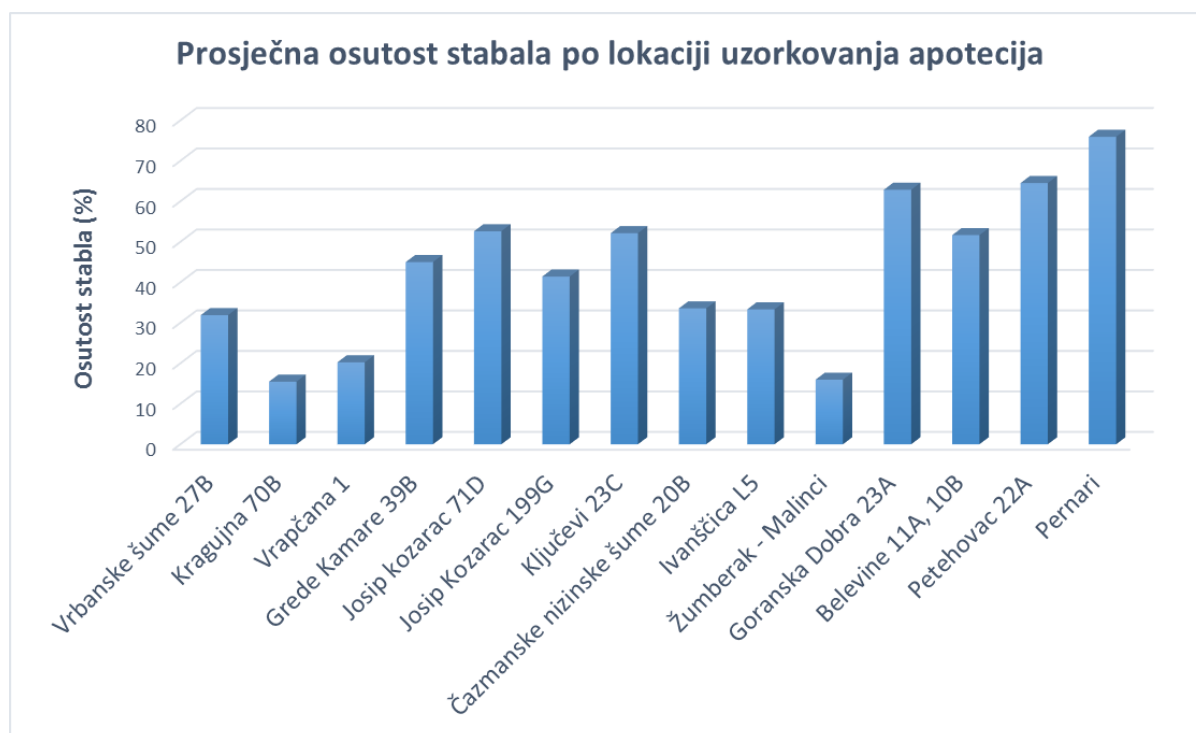
Slika 28. Prikaz zahvaćenih područja bolesti uzrokovane gljivom *H. fraxineus* u Hrvatskoj u 2015. godini, te negativni nalazi bez prisutnosti bolesti u mediteranskom području (narančaste točke uzorkovanja)

Figure 28. Display of diseased areas caused by the fungus *H. fraxineus* in Croatia in 2015 and negative disease free locations in Mediterranean area (orange sampling locations)

### 3.1.2. Osutost stabala

Oštećenost istraživanih sastojina jasena u Hrvatskoj iskazana je stupnjevima osutosti krošanja procijenjenih stabala (Slika 30). U tim sastojinama potvrđena je prisutnost i infekcija gljivom *H. fraxineus* koja je jedan od sigurnih uzročnika povećane osutosti krošanja.

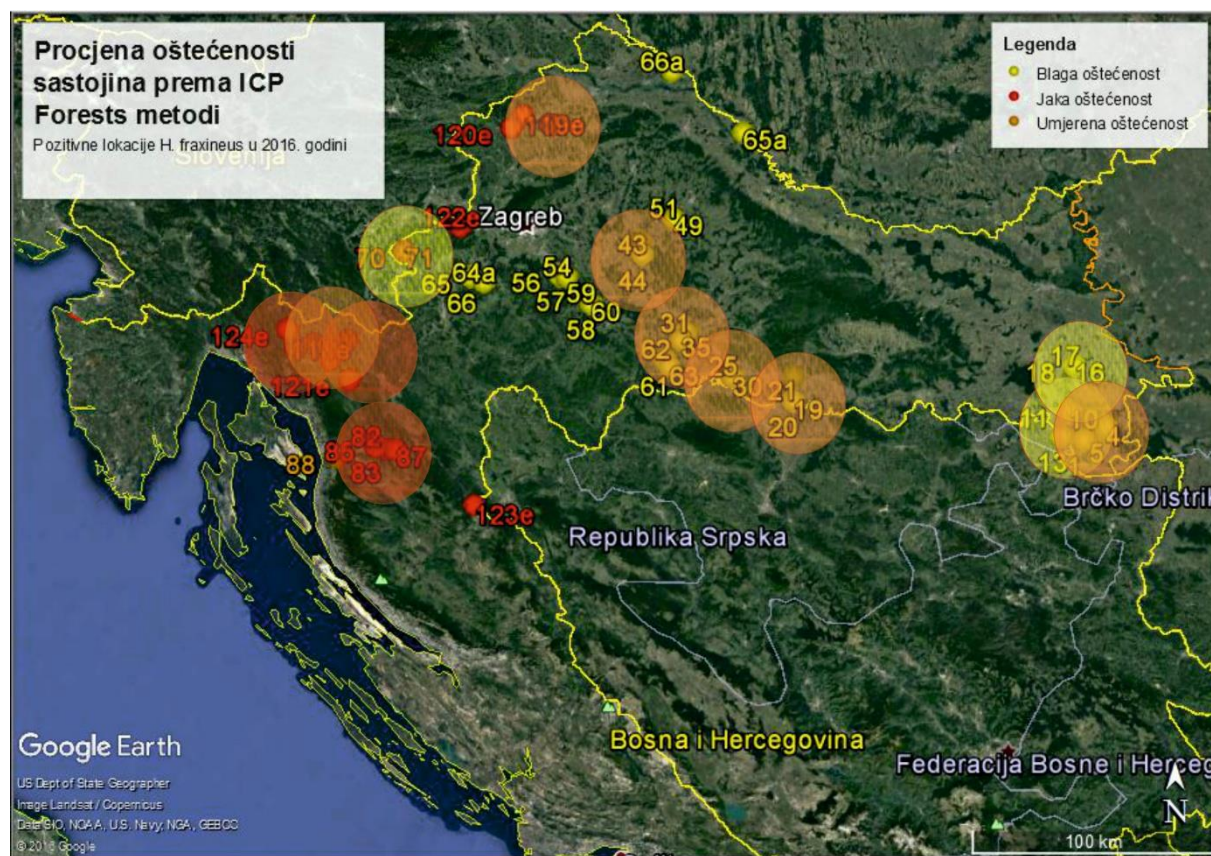
Jako oštećene sastojine običnog jasena definirane prosjekom osutosti krošnje procijenjenih stabala iznad 60% nalaze se na lokacijama na kojima se u Hrvatskoj bolest najranije pojavila (Goranska Dobra 23A, Petehovac 22A i Pernari) (Slika 29). Umjerena oštećenost sastojina (26 - 60%) zabilježena je u srednjoj i nizinskoj Hrvatskoj (Vrbanjske šume 27B, Grede Kamare 39B, Josip Kozarac 71D, Josip Kozarac 199G, Ključevi 23C, Čazmanske nizinske šume 20B), te na običnom jasenu u gorsko-planinskim područjima na lokacijama Belevine 11A, Belevine 10B i Ivanščica L5 (Slika 29). Blaga oštećenost sastojine (11 - 25%) evidentirala se na lokacijama Kragujna 70B, Vrapčana 1 i Žumberak – Samoborsko gorje (Slika 29).



Slika 29. Prosječna osutost stabala u sastojini prema lokacijama uzorkovanja

Figure 29. Average assessment of tree damage in stands according to sampling locations





Slika 30. Oštećenost sastojina zaraženih gljivom *H. fraxineus* u Hrvatskoj

Figure 30. Stand damage degree on infected sites with fungus *H. fraxineus* in Croatia

### 3.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena

Testirane su korelacije osutosti stabala za pojedini lokalitet s brojem produciranih apotecija na otpalim lisnim rahisima unutar istih mjeseci praćenja za svaku vrstu domaćina (običnog i poljskog jasena) zasebno (Slika 29). Za testiranje upotrijebljen je Pearson test korelacije.

Kod običnog jasena postoji statistički značajna korelacija ( $p=0.008$ ) između broja apotecija (neovisno o mjesecima) i oštećenosti sastojina gdje je utvrđena pozitivna korelacija ( $r=0.203$ ). Utvrđena je statistički značajna korelacija broja apotecija i oštećenosti sastojina po mjesecima praćenja za lipanj (negativna korelacija  $p=0.045$ ,  $r=-0.155$ ), za srpanj (pozitivna korelacija  $p=0.001$ ,  $r=0.260$ ), te za rujun (pozitivna korelacija  $p=0.000$ ,  $r=0.357$ ). Utvrđena je i statistički značajna ( $p<0.01$ ) pozitivna korelacija u broju apotecija prema mjesecima praćenja, gdje sva tri mjeseca praćenja međusobno koreliraju (Tablica 8).

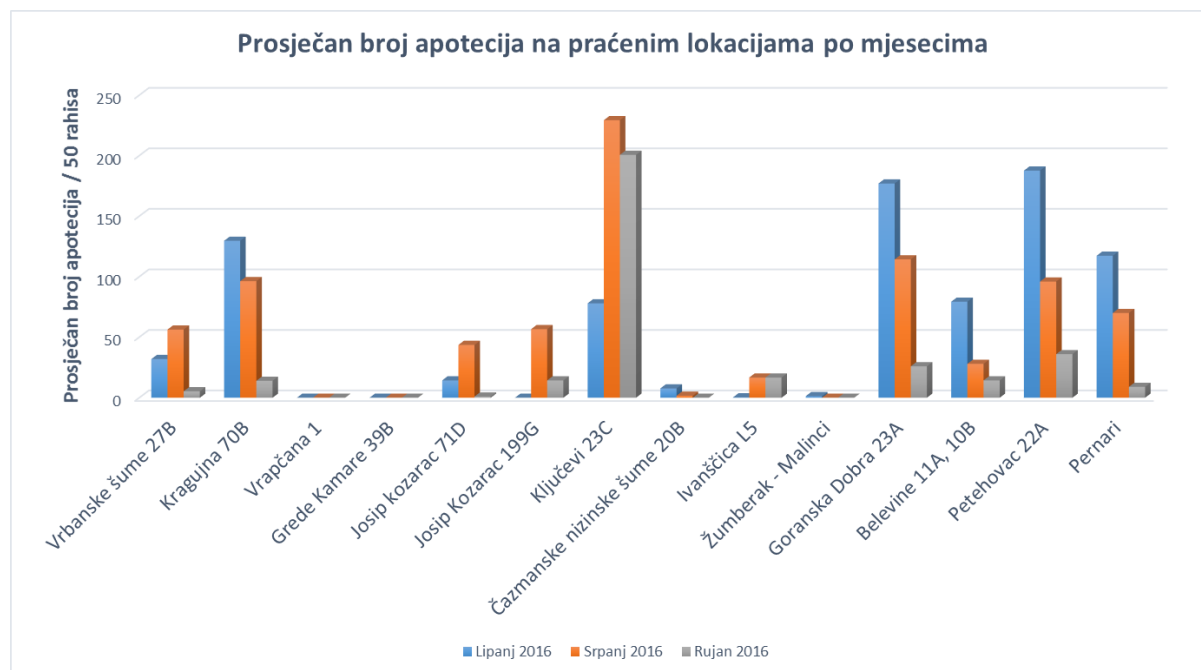
Kod poljskog jasena postoji statistički značajna korelacija ( $p<0.000$ ) između broja apotecija (neovisno o mjesecima) i oštećenosti sastojina gdje je utvrđena pozitivna korelacija ( $r=0.610$ ).



Utvrđena je statistički značajna korelacija broja apotecija i oštećenosti sastojina po mjesecima praćenja za lipanj (pozitivna korelacija  $p=0.000$ ,  $r=-0.635$ ), za srpanj (pozitivna korelacija  $p=0.000$ ,  $r=0.570$ ), te za rujan (pozitivna korelacija  $p=0.000$ ,  $r=0.340$ ). Utvrđena je i statistički značajna ( $p<0.01$ ) pozitivna korelacija u broju apotecija prema mjesecima praćenja, gdje sva tri mjeseca praćenja međusobno koreliraju (Tablica 9).

Da bi se utvrdile signifikantne razlike između lokacija prema broju apotecija, provjeravana je normalnost distribucije Shapiro–Wilkovim testom zbog malog broja uzoraka ( $N=9$ ). Mjerenja su bila nezavisna i nema značajnih outliera. Prema Shapiro-Wilkovom testu većina podataka ima normalnu distribuciju (Tablica 10).

Na lokacijama 3 (Vrapčana 1) i 4 (Grede Kamare 39B) podaci su uniformno distribuirani, te lokacija 10 (Žumberak - Malinci) i 12 (Belevine 10B, 11A) odstupaju od normalne distribucije, ali smo ih zbog malog broja podataka ipak uzeli u obzir. Potom je proveden Levenov test homogenosti varijance koji je utvrdio da nema homogenosti ( $p<0.05$ ). ANOVA je pokazala da postoji statistički signifikantna razlika između grupa, da se utvrdi između kojih grupa koristio se post-hoc test Games-Howell koji ne zahtijeva homogenost varijanci (Tablica 11). Games-Howell test pokazao je statistički signifikantnu razliku ( $p<0.05$ ) kod lokacije 7 (Ključevi - 23C) u prilogu (Tablica 42) prema većini drugih lokacija (lokacija 3, 4, 5, 6, 8, 9 i 10).



Slika 31. Prosječan broj apotecija na praćenim lokacijama po mjesecima sakupljanja

Figure 31. Average number of apothecium on sampling locations according to time sampling

Tablica 8. Korelacija prosječne osutosti stabala i broja apotecija za obični jasen

Table 8. Correlation of tree damage and number of apothecium for common ash

		ICP_6mj	Apothecium_6mj			ICP_7mj	Apothecium_7mj
ICP_6mj	Pearson Correlation	1	-0,155*	ICP_7mj	Pearson Correlation	1	0,260**
	Sig. (2-tailed)		0,045		Sig. (2-tailed)		0,001
	N	168	168		N	168	168
Apothecium_6mj	Pearson Correlation	-0,155*	1	Apothecium_7mj	Pearson Correlation	0,260**	1
	Sig. (2-tailed)	0,045			Sig. (2-tailed)	0,001	
	N	168	168		N	168	168

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

		ICP_9mj	Apothecium_9mj			ICP_total	Apothecium_total
ICP_9mj	Pearson Correlation	1	0,357**	ICP_total	Pearson Correlation	1	0,203**
	Sig. (2-tailed)		0,000		Sig. (2-tailed)		0,008
	N	168	168		N	168	168
Apothecium_9mj	Pearson Correlation	0,357**	1	Apothecium_total	Pearson Correlation	0,203**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000			Sig. (2-tailed)	0,008	
	N	168	168		N	168	168

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

KORELACIJA BROJA APOTECIJA PO MJESECIMA PRACENJA		Apothecium_6mj	Apothecium_7mj	Apothecium_9mj
Apothecium_6mj	Pearson Correlation	1	0,644**	0,434**
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000
	N	168	168	168
Apothecium_7mj	Pearson Correlation	0,644**	1	0,908**
	Sig. (2-tailed)	0,000		0,000
	N	168	168	168
Apothecium_9mj	Pearson Correlation	0,434**	0,908**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	
	N	168	168	168

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tablica 9. Korelacija osutosti stabala i broja apotecija za poljski jasen

Table 9. Correlation of tree damage and number of apothecium for narrow-leaved ash

		ICP_6mj	Apothecium_6mj			ICP_7mj	Apothecium_7mj
ICP_6mj	Pearson Correlation	1	0,635**	ICP_7mj	Pearson Correlation	1	0,570**
	Sig. (2-tailed)		0,000		Sig. (2-tailed)		0,000
	N	126	126		N	126	126
Apothecium_6mj	Pearson Correlation	0,635**	1	Apothecium_7mj	Pearson Correlation	0,570**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000			Sig. (2-tailed)	0,000	
	N	126	126		N	126	126

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

		ICP_9mj	Apothecium_9mj			ICP_total	Apothecium_total
ICP_9mj	Pearson Correlation	1	0,340**	ICP_total	Pearson Correlation	1	0,610**
	Sig. (2-tailed)		0,000		Sig. (2-tailed)		0,000
	N	126	126		N	126	126
Apothecium_9mj	Pearson Correlation	0,340**	1	Apothecium_total	Pearson Correlation	0,610**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000			Sig. (2-tailed)	0,000	
	N	126	126		N	126	126

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

KORELACIJA BROJA APOTECIJA PO MJESECIMA PRAČENJA		Apothecium_6mj	Apothecium_7mj	Apothecium_9mj
Apothecium_6mj	Pearson Correlation	1	0,932**	0,693**
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000
	N	126	126	126
Apothecium_7mj	Pearson Correlation	0,932**	1	0,687**
	Sig. (2-tailed)	0,000		0,000
	N	126	126	126
Apothecium_9mj	Pearson Correlation	0,693**	0,687**	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	
	N	126	126	126

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tablica 10. Test normalnosti distribucije broja apotecija za lokacije

Table 10. Normality test of apothecium number for the sampling locations

Test normalnosti distribucije <sup>c,d</sup>							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apotecij	1	0,161	9	0,200*	0,938	9	0,562
	2	0,174	9	0,200*	0,918	9	0,377
	5	0,201	9	0,200*	0,883	9	0,168
	6	0,269	9	0,060	0,817	9	0,032
	7	0,330	9	0,005	0,804	9	0,023
	8	0,316	9	0,010	0,772	9	0,010
	9	0,211	9	0,200*	0,867	9	0,114
	10	0,519	9	0,000	0,390	9	0,000
	11	0,229	9	0,192	0,902	9	0,265
	12	0,286	9	0,033	0,713	9	0,002
	13	0,171	9	0,200*	0,905	9	0,279
	14	0,183	9	0,200*	0,908	9	0,305

\*. This is a lower bound of the true significance.  $p > 0.01$

a. Lilliefors Significance Correction

c. Apotecij is constant when Lokacija = 3. It has been omitted.

d. Apotecij is constant when Lokacija = 4. It has been omitted.

Tablica 11. Levenov test i ANOVA

Table 11. Leven test and ANOVA

Levenov test homogenosti varijance			
Apotecij			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8,622	13	112	0,000

$p < 0.05$  nema homogenosti

ANOVA					
Apotecij					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	334841,048	13	25757,004	10,859	0,000
Within Groups	265653,111	112	2371,903		
Total	600494,159	125			

## 3.2. Istraživanja izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

### 3.2.1. Identifikacija *Hymenoscyphus fraxineus* i ostalih izoliranih gljiva

Prilikom izolacije gljive *H. fraxineus* iz tkiva jasena izolirane su i druge vrste gljiva za koje se radilo morfološku identifikaciju vrste pomoću dobivanja čistih kultura, fruktifikacije gljiva i mikroskopske morfološke analize. Neke od najčešće izoliranih vrsta osim gljivičnog patogena *H. fraxineus* iz tkiva jesena bile su vrste prikazane (Tablica 12).

Izolacije gljive *H. fraxineus* obavljane su iz većine biljnih organa: izbojaka, grančica i grana, drvnog tkiva poprečnih presjeka trupaca stabala, kao i drvnog tkiva poprečnih presjeka baze debla. Uspješnost izolacije opadala je od vrha prema dnu stabla, dakle na mlađim izbojcima i grančicama u krošnji uspješnost izolacije je bila veća nego u središnjem dijelu debla gdje često nisu bili prisutni simptomi diskoloracije i nekroze (posebice na poljskom jasenu). Izolacija iz baze debla također je bila niža nego u krošnji, ali je bioraznolikost gljivičnih vrsta bila veća.

Gljivični patogen *H. fraxineus* izoliran je najčešće iz živog tkiva ispod stanica kore (floem, kambij i ksilem), ali i iz stanica drva (bjeljika i srž). Uspješnije izolacije dobivale su se iz živih stanica kambija i ksilema, posebice na tanjim granama, grančicama i svježim izbojcima koji su pokazivali simptome pojave nekrotičnih lezija. Izolacije *H. fraxineus* su bile uspješnije

na granici prelaska mrtvog u još živo inficirano tkivo. Izolacije iz mrtvog tkiva često su bile neuspješne zbog prisutnosti drugih brzorastućih saprotrofnih vrsta gljiva koje na hranidbenoj podlozi imaju mogućnost brzog preraštavanja gljive *H. fraxineus*, te onemogućavaju njen razvoj.

Tablica 12. Najčešće izolirane vrste gljiva uz *H. fraxineus* iz tkiva jasena

Table 12. The most commonly isolated fungal species with *H. fraxineus* from ash tissue

Gljiva	Vrsta domaćina	Biljni organ	Stanje biljnog organa prilikom uzorkovanja
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Phoma</i> spp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Trichoderma viride</i>	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - baza, deblo, grana; grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Epicoecum nigrum</i>	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza, deblo	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama
<i>Alternaria alternata</i>	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - baza, deblo, grana; grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - grana; grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Drveno tkivo - baza, grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Hysterographium fraxini</i>	<i>F. angustifolia</i> ; <i>F. ornus</i>	Grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Armillaria</i> sp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Hypocrea</i> spp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza, deblo, grana; grančice; izbojci	Poprečni prerez drvnog tkiva s vidljivim diskoloracijama; izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima
<i>Phoma exigua</i>	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Fusarium solani</i>	<i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Cadophora</i> sp.	<i>F. excelsior</i> ; <i>F. angustifolia</i>	Drveno tkivo - baza	Poprečni prerez baze debla s vidljivim diskoloracijama
<i>Bionectria ochroleuca</i>	<i>F. angustifolia</i>	Izbojci	Izbojci s nekrozama i mrtvim segmentima

Uspješnost izolacije gljive *H. fraxineus* u nizinskim područjima poljskog jasena također ovisi o vremenskim uvjetima te o godišnjem dobu uzorkovanja, odnosno o fazi aktivnosti same gljive, tako se najuspješnije izolacije mogu obaviti od sredine travnja do kraja svibnja, dok kasnije prelaskom u ljetno razdoblje inaktivnost gljive se iskazuje i slabijim mogućnostima izolacije gljive. U vrućim ljetnim mjesecima uspješnost izolacije *H. fraxineus* vrlo je niska, dok se krajem kolovoza i u prvoj polovici rujna mogućnosti uspješnosti izolacije popravljaju gotovo na razinu na kojoj je bila početkom ljeta. Mogućnosti izolacije nakon sredine rujna drastično opadaju s snižavanjem vanjske temperature te dormantnošću gljive *H. fraxineus* u zimskom periodu. Prikaz svih lokacija s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva prikazani su tablicama (Tablica 13; Tablica 14; Tablica 15; Tablica 16; Tablica 17; Tablica 18; Tablica 19; Tablica 20; Tablica 21).

Tablica 13. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (1/9)

Table 13. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (1/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
1	G.J. Vrbanske šume - Sočna 27B Vrbanja	44.989327	18.861422	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
					<i>Armillaria</i> sp.	Baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Baza debla
2		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje			
			<i>Hysteroglyphium fraxini</i>		Izbojci krošnje	
			<i>Trichoderma viride</i>		Baza debla; deblo	
			<i>Epicoccum nigrum</i>		Baza debla; deblo	
			<i>Phomopsis</i> spp.		Baza debla	
3		<i>Phoma exigua</i>	Baza debla			
			<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>		Izbojci krošnje	
			<i>Hysteroglyphium fraxini</i>		Izbojci krošnje	
			<i>Fusarium</i> spp.		Izbojci krošnje; grančice	
			<i>Trichoderma viride</i>		Baza debla; deblo	
4	<i>Hypocrea</i> spp.	Baza debla; deblo				
		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje			
			<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje		
			<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla		
			<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla		
5	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>		Izbojci krošnje			
		<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje			
		<i>Cadophora</i> sp.	Baza debla			
		<i>Armillaria</i> sp.	Baza debla			
		6	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice i deblje grane		
<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo					
<i>Alternaria alternata</i>	Baza debla; deblo					
<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla					
<i>Phoma</i> spp.	Baza debla					
7	G.J. Vrbanske šume 132a Vrbanja	45.009360	18.976098	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje, baza debla
					<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Deblo
					<i>Fusarium</i> spp.	Baza debla
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje, baza debla
8		<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane			
			<i>Phoma</i> spp.		Baza debla	
			<i>Phoma exigua</i>		Baza debla	
			9		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice i deblje grane
						<i>Fusarium solani</i>
<i>Alternaria alternata</i>		Baza debla				



Tablica 14. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (2/9)

Table 14. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (2/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
10	G.J. Kusare 49a Županja	45.092314	18.784470	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Fusarium solani</i>	Baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Baza debla
11		45.095917	18.789211		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
12		45.093856	18.792484		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane; izbojci
13	G.J. Kragujna - Poloj 70B Županja	45.005410	18.748070	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; deblje grane
					<i>Hypocrea</i> spp.	Deblo
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
14		45.005131	18.748192		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje, baza debla
					<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; Baza debla
15		45.004935	18.748070		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje, baza debla
					<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; Baza debla
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo
16	G.J. Vrapčana - 1 Vinkovci	45.261182	18.827676	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje
17		45.261234	18.827824		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Baza debla
18		45.260951	18.827575		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
19	G.J. Ključevi - 23C Nova Gradiška	45.166199	17.355093	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla, deblo
					<i>Fusarium solani</i>	Baza debla
20		45.166128	17.355145		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; deblje grane
					<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phoma</i> spp.	
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla
21		45.166251	17.355077		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Deblje grane; grančice; izbojci
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla

Tablica 15. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (3/9)

Table 15. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (3/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
22	G.J. Gradiška brda - 68 Klonska sjemenska plantaža Nova Gradiška HR FAN SP 122/301	45.252187	17.361800	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje
23		45.252200	17.361963		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Hypocrea</i> spp.	Izbojci krošnje
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
24		45.253107	17.362052		<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje
25	G.J. Grede Kamare - 39B Jasenovac	45.259467	17.048345	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phoma</i> spp.	Izbojci krošnje
					<i>Bionectria ochroleuca</i>	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; deblje grane; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje, baza debla
26		45.259688	17.048492		<i>Phoma</i> spp.	Izbojci krošnje, baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje, baza debla
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
27		45.259472	17.048492		<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje
28	G.J. Grede Kamare - 42C Jasenovac	45.258206	17.050951	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
29		45.255115	17.051017		<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
30		45.255735	17.046678		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
31	G.J. Josip Kozarac - 56A Lipovljani	45.419835	16.804094	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Deblje grane; grančice
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Alternaria alternata</i>	Baza debla; grančice
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane
32		45.422345	16.802255		<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla; deblo
					<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; baza debla
33		45.423348	16.805926		<i>Hypocrea</i> spp.	Izbojci krošnje; grančice
					<i>Armillaria</i> sp.	Baza debla

Tablica 16. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (4/9)

Table 16. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (4/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
34	G.J. Josip Kozarac - 72C Lipovljani	45.394961	16.787867	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane
35		45.392429	16.783058		Phoma spp.	Izbojci krošnje
					Fusarium spp.	Grančice; baza debla
					Phoma exigua	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
					Botryosphaeria stevensii	Deblje grane; grančice
					Epicoccum nigrum	Baza debla; deblo
36		45.394479	16.788639		Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; baza debla
	Epicoccum nigrum			Baza debla; deblo		
					Armillaria sp.	Baza debla
37	G.J. Josip Kozarac - 71D Lipovljani	45.393063	16.780440	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane
38		45.393253	16.780456		Fusarium spp.	Deblje grane; baza debla
					Cadophora sp.	Baza debla
					Alternaria alternata	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; baza debla
					Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
					Phomopsis spp.	Baza debla
39		45.393177	16.780311		Phoma spp.	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
	Botryosphaeria stevensii			Deblje grane; grančice		
					Armillaria sp.	Baza debla
					Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane
40	G.J. Josip Kozarac - 199G Lipovljani	45.425077	16.822017	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
41		45.425043	16.822056		Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
					Epicoccum nigrum	Baza debla; deblo
					Fusarium solani	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
					Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
					Epicoccum nigrum	Baza debla; deblo
42		45.425127	16.822123		Phomopsis spp.	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
	Hysterographium fraxini			Izbojci krošnje		
					Alternaria alternata	Izbojci krošnje, baza debla
43	G.J. Čazmanske nizinske šume - 20B Čazma	45.707409	16.586785	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
44		45.707436	16.586727		Fusarium spp.	Grančice; baza debla
					Botryosphaeria stevensii	Grančice
45		45.707435	16.586717		Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
					Epicoccum nigrum	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
					Phomopsis spp.	Baza debla

Tablica 17. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (5/9)

Table 17. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (5/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
46	Klonska sjemenska plantaža Čazma HR FAN SP 123/298	45.752674	16.583326	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
47		45.753378	16.582857		Fusarium spp.	Izbojci krošnje
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
					Botryosphaeria stevensii	Izbojci krošnje
					Hypocrea spp.	Izbojci krošnje
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
48		45.752746	16.582349		Hypocrea spp.	Izbojci krošnje
			Bionectria ochroleuca	Izbojci krošnje		
49	G.J. Česma 16a Čazma	45.836129	16.754763	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
50		45.837707	16.754763		Phoma spp.	Baza debla
					Fusarium spp.	Baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
					Phoma spp.	Baza debla
					Hypocrea spp.	Izbojci krošnje; grančice
51		45.838375	16.756135		Alternaria alternata	Baza debla; deblo
			Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje		
			Trichoderma viride	Baza debla		
52	G.J. Turopoljski lug 87a	45.631344	16.191781	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
53		45.629900	16.194053		Phoma spp.	Baza debla
					Fusarium spp.	Grančice; baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice
					Epicoccum nigrum	Baza debla
					Armillaria sp.	Baza debla
54		45.629038	16.191161		Alternaria alternata	Grančice; baza debla
			Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje		
			Botryosphaeria stevensii	Izbojci krošnje		
			Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane		
55	G.J. Turopoljski lug 80d	45.635301	16.156623	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
56		45.632599	16.155089		Hypocrea spp.	Izbojci krošnje; grančice
					Epicoccum nigrum	Baza debla
					Alternaria alternata	Grančice; baza debla
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice baza debla
					Botryosphaeria stevensii	Izbojci krošnje
57		45.633800	16.158586		Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane
			Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje		
			Fusarium spp.	Grančice; baza debla		
58	G.J. Belčičev gaj 53; 54 Odransko polje	45.530381	16.314064	Fraxinus angustifolia	Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
59		45.531678	16.315070		Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane
					Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje; grančice baza debla
					Botryosphaeria stevensii	Izbojci krošnje
60		45.534697	16.319244		Hymenoscyphus fraxineus	Izbojci krošnje
			Cadophora sp.	Baza debla		
			Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane		

Tablica 18. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (6/9)

Table 18. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (6/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
61	G.J. Sunja posavske šume 94a; 15a	45.321393	16.697979	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Fusarium</i> spp.	Grančice; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla
62		45.325010	16.699190		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
63		45.297718	16.721217		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
64	G.J. Jastrebarski lugovi 29	45.630740	15.688074	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; deblje grane
					<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Hypocrea</i> spp.	Baza debla
65		45.628958	15.689288		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; baza debla
					<i>Hypocrea</i> spp.	Baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci; grančice, baza debla
66		45.630058	15.693660		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Deblje grane; baza debla
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
67	Ivanščica L1	46.179721	16.120705	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Deblo; baza debla
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
68	Ivanščica L3	46.182698	16.126570		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Deblje grane; baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci; grančice, baza debla
69	Ivanščica L5	46.187402	16.108232		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
70	Park prirode Žumberak - Samoborsko gorje - Malinci	45.723232	15.343835	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
71		45.723247	15.343861		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje
72		45.723318	15.344030		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Hypocrea</i> spp.	Izbojci krošnje
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane

Tablica 19. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (7/9)

Table 19. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (7/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
73	G.J. Goranska Dobra - 23A Vrbovsko	45.394995	15.050652	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Grančice; baza debla
74		45.394888	15.050631		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
75		45.394897	15.050492		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Deblje grane; grančice
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Trichoderma viride</i>	Baza debla; deblo; deblje grane
76	G.J. Belevine - 11A, 10B Zalesina	45.383596	14.872510	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Deblje grane; grančice
77		45.383509	14.873481		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Hypocrea</i> spp.	Izbojci krošnje
					<i>Fusarium</i> spp.	Deblje grane; baza debla
					<i>Armillaria</i> sp.	Baza debla
78		45.382926	14.873513		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci; grančice, baza debla
79	G.J. Petehovac - 22A Delnice	45.371741	14.781180	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
80		45.371343	14.781120		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; baza debla
					<i>Phoma exigua</i>	Baza debla
					<i>Cadophora</i> sp.	Baza debla
81		45.371269	14.780964		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
					<i>Armillaria</i> sp.	Baza debla

Tablica 20. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (8/9)

Table 20. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (8/9)

Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
82	Brinje - Pernari	45.012249	15.197498	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
83		45.012613	15.197606		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Epicoccum nigrum</i>	Baza debla; deblo
84		45.012439	15.197323		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
					<i>Cadophora</i> sp.	Baza debla
85	Brinje L2 Križopolje	45.026501	15.189707	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
86	Brinje L3 Lipice	45.001524	15.251416		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Hypocrea</i> spp.	Deblje grane; grančice; deblo
87	Brinje L4 Glibodol	44.999181	15.304540		<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Izbojci krošnje; grančice; deblje grane; deblo; baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
88	Vratnik L1	44.974934	14.988289		<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
89	Vratnik L2	44.976650	14.985905	<i>Fraxinus ornus</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
					<i>Phomopsis</i> spp.	Baza debla
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
90	Vratnik L3	44.983051	14.979168		<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
91	Jablanac L1	44.715056	14.892225	<i>Fraxinus ornus</i>	<i>Hypocrea</i> spp.	Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
92	Jablanac L2	44.723228	14.897708		<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
93	Jablanac L3	44.724507	14.897423		<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Fusarium</i> spp.	Izbojci krošnje; deblo
94	Lubenice L1	44.875056	14.344583	<i>Fraxinus ornus</i>	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice; deblo
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
95	Lubenice L2	44.887144	14.331915		<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Phoma</i> spp.	Baza debla
96	Lubenice L2	44.892526	14.327150		<i>Hysteroglyphium fraxini</i>	Izbojci krošnje
					<i>Alternaria alternata</i>	Izbojci krošnje; grančice, baza debla



Tablica 21. Lokacije s uzorkovanim stablima i pripadajućim izoliranim vrstama gljiva (9/9)

Table 21. Locations with sampled trees and corresponding isolated fungal species (9/9)

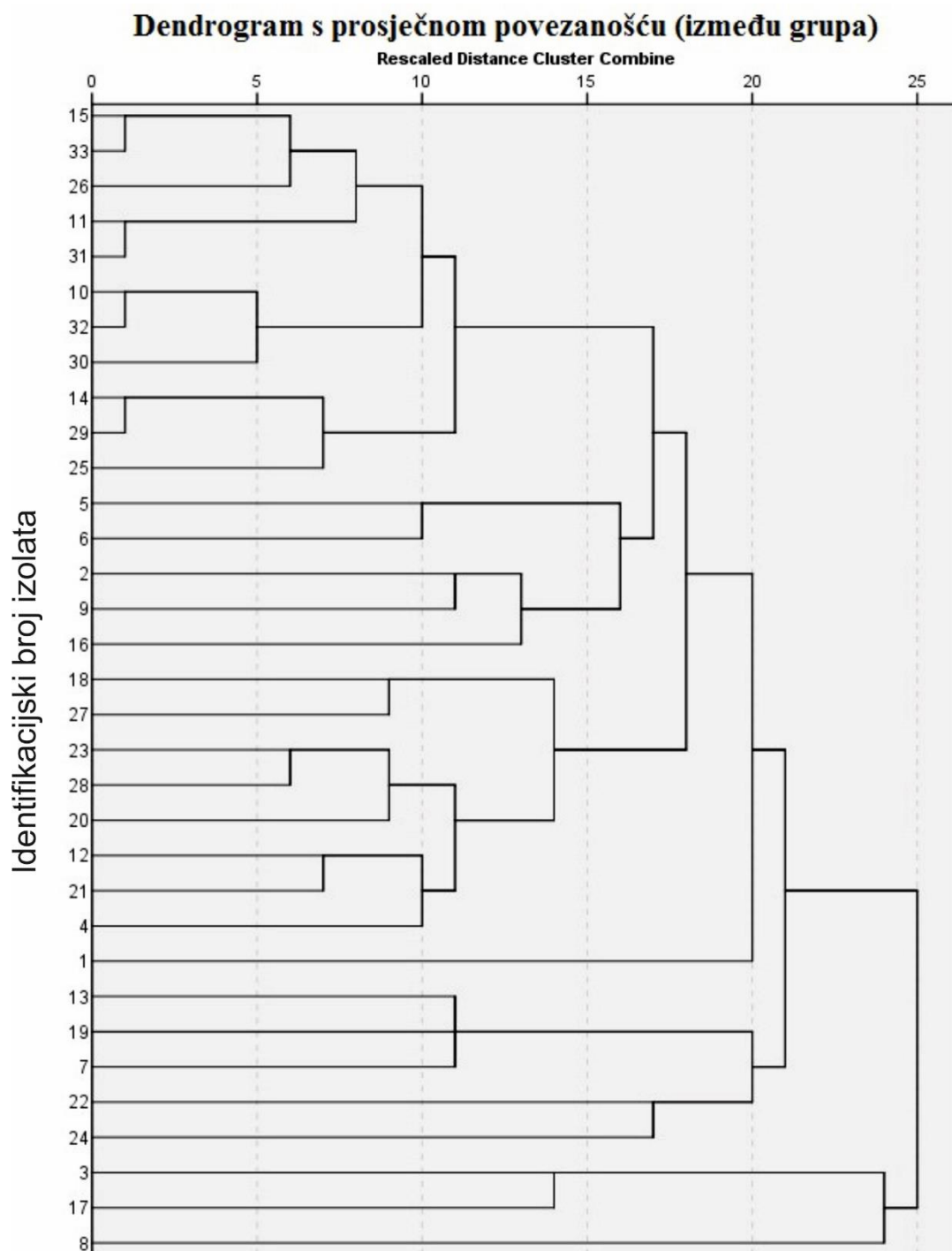
Broj stabla	LOKACIJA	Geografska širina $\phi$ N	Geografska dužina $\lambda$ E	VRSTA DOMAĆINA	IZOLIRANA GLJIVA	SEKCIJA STABLA
97	Gologorica L1	45.262802	14.027645	Fraxinus ornus	Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
					Hypocrea spp.	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice
					Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane
98	Gologorica L2	45.260706	14.035222		Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
99	Gologorica L3	45.260936	14.041974		Phomopsis spp.	Baza debla
					Botryosphaeria stevensii	Izbojci krošnje; Deblje grane; grančice; deblo
					Phomopsis spp.	Baza debla
100	Oprtalj L1	45.383501	13.814938	Fraxinus ornus	Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
101	Oprtalj L2	45.376522	13.819558		Phomopsis spp.	Baza debla
					Hysterographium fraxini	Izbojci krošnje
					Alternaria alternata	Izbojci krošnje; grančice, baza debla
102	Oprtalj L3	45.373317	13.824686		Fusarium spp.	Izbojci krošnje; deblo
				Trichoderma viride	Baza debla; deblo; deblje grane	

### **3.2.2. Morfološka tipizacija izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (fenotipizacija izolata)**

Da bi morfološke karakteristike izolata gljive *H. fraxineus* mogli povezati s različitim djelovanjem, aktivnošću, virulentnošću, a naposljetku i genetskim razlikama između pripadajućih izolata, potrebno je opisati i kvantificirati morfološki izgled svakog pojedinog izolata. Naknadnim istraživanjem možemo utvrditi jesu li ili ne određene morfološke karakteristike krucijalne u diferencijaciji pojedinih izolata i ispoljavanju određenog svojstva povezanog s tom morfološkom karakteristikom.

#### **Morfološka tipizacija izolata izgleda micelija u kulturi**

Kod dobivanja morfotipova testiranih izolata, promatrali smo sve parametre morfološkog opisa izolata koje možemo opisati i kvantificirati. Prema izgledu micelija u kulturi promatrali smo značajke odnosno obilježja kulture nakon 14 dana rasta. Glavna obilježja kulture bila su boja micelija (bijela, narančasta, bijela s narančastim segmentima, žuta), oblik micelija (okrugli, ovalni, nepravilan), oblik ruba micelija (puni, isprekidani), formiranje fikalida (pojavnost, nepojavnost), produkcija sekundarnih metabolita (viridin) (pojavnost, nepojavnost). Ta su svojstva razvrstana u nekoliko potkategorija te su im dodijeljene binarne vrijednosti (0) i (1) ukoliko je svojstvo bilo odsutno ili prisutno. Popis odabranih promatranih izolata nalazi se u prilogu (Tablica 47), a to su identični izolati koji su se koristili i u testovima morfološke tipizacije prema rastu izolata na različitim temperaturama, te u testovima genetske varijabilnosti.



Legenda: 1- Lipovljani 199G; 2-Nova Gradiška K1; 3-Jasenovac 42C; 4-Čazma K3; 5-Čazma K23; 6-Čazma K40; 7-Brinje L2; 8-Brinje L3; 9-Brinje L4; 10-Ivanščica L1; 11-Ivanščica L3; 12-Ivanščica L5; 13-Delnice L3.1; 14-Zalesina L3.2; 15-Vrbovsko L1; 16-Vrbanjske šume 91B.1; 17-Vrbanjske šume 91B.2; 18-Vrbanjske šume 91B.3; 19-Soulmes 1I; 20-Soulmes 2I; 21-Soulmes 1II; 22-Nafrature 1I; 23-Nafrature 3I; 24-Nafrature P; 25-Gembloux N2; 26-Gembloux 1III; 27-Gembloux 7II; 28-Chevetogne A; 29-Chevetogne 4II; 30-Heer 3II; 31-Rulles 1IIF; 32-Rulles 2II; 33-Flouriffoux 3I

Slika 32. Dendrogram različitih morfotipova izolata

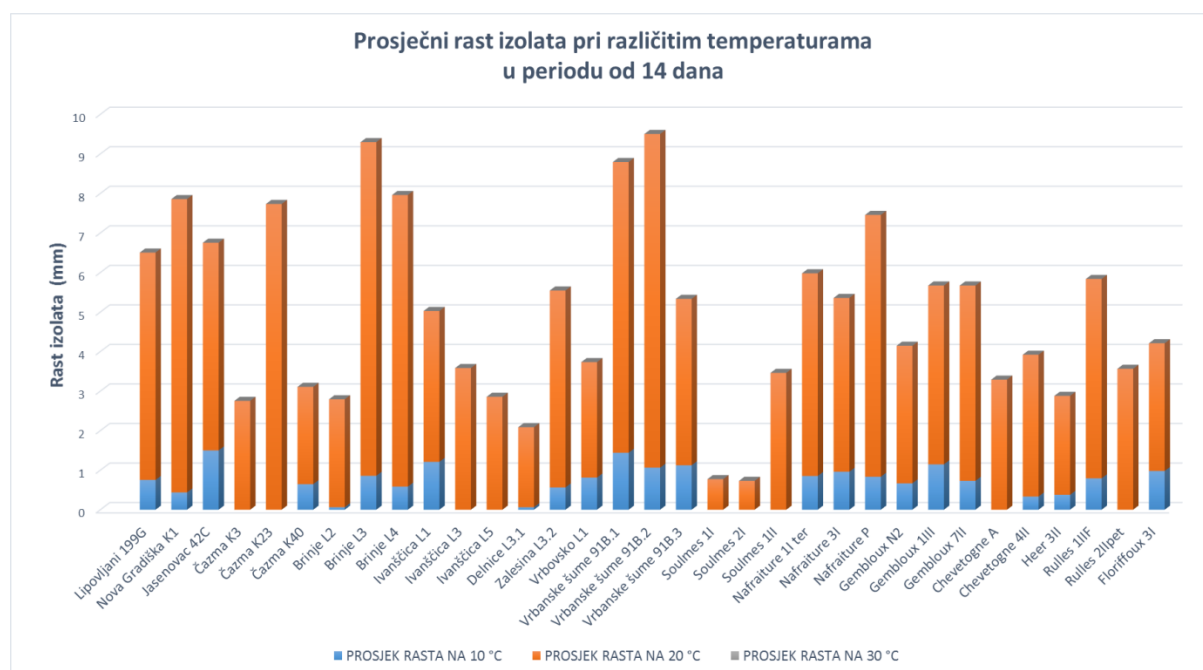
Figure 32. Dendrogram of different isolate morphotypes

Binarni podaci zahtijevaju Jaccard koeficijent, te je prema tome izrađen dendrogram koji opisuje sličnosti odnosno razlike između pojedinih izolata temeljem morfoloških dodijeljenih vrijednosti. Rezultati dendrograma daju nam grafički prikaz koji ukazuje da se svi izolati dijele na dva glavna morfotipa (Slika 32). Glavna obilježja koja generalno karakteriziraju morfotip 1 su: bijela boja micelija, nepravilan oblik micelija, isprekidani rub micelija, neformiranje fjalida, bez vizualne prisutnosti produkcije sekundarnih metabolita. Glavna obilježja koja generalno karakteriziraju morfotip 2 su: bijela i narančasta boja micelija (50:50), okrugli i ovalni oblik micelija, puni rub micelija, neformiranje fjalida, s vizualnom prisutnošću produkcije sekundarnih metabolita.

Morfotip1 pripadaju izolati 3, 17 i 8 (3 i 17 sličniji), a morfotipu2 svi ostali izolati. Morfotip2 dijeli se ponovno na morfotip2.1 (izolati 24, 22, 7, 19, 13) i morfotip2.2. Morfotip2.2 dijeli se dalje na morfotip 2.2.1 kome pripada samo izolat broj 1 i morfotip2.2.2. Morfotip 2.2.2. dijeli se na dvije veće skupine morfotip2.2.2.1 u koji spadaju izolati 4, 21, 12, 20, 28, 23, 27 i 18, te morfotip2.2.2.2 s izolatima prve podskupine (16, 9, 2, 6, 5) i druge podskupine (25, 29, 14, 30, 32, 10, 31, 11, 26, 33, 15). Morfološki najbliži izolati su 15-30, 11-31, 10-32, 14-29. Iz dendrogramskog prikaza može se iščitati da morfološka tipizacija nije korelirana s geografskom rasprostranjenosti izolata, odnosno ne odgovara geografskom porijeklu izolata (Hrvatska, Belgija).

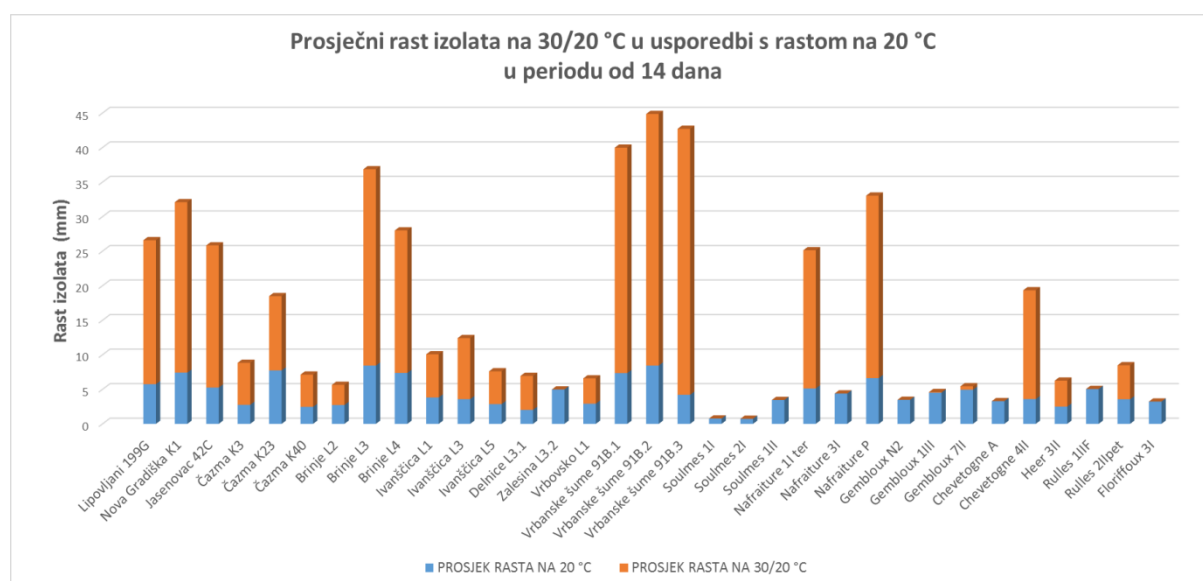
### **Morfološka tipizacija rasta izolata pri različitim temperaturama**

Iz grafikona prosječnog rasta izolata može se iščitati da 33% hrvatskih i belgijskih izolata na temperaturi od 10 °C ne raste (Slika 33). Temperature na 10 °C drastično su smanjile rast izolata, te su izolati rasli od 0.73 – 43.10 puta sporije nego na 20 °C. Pri temperaturi od 20 °C svi su izolati pokazivali rast neovisno o državi porijekla međutim postoje značajne varijacije u rastu između pojedinih izolata. Na temperaturi od 30 °C nije rastao niti jedan izolat neovisno o državi porijekla. Vraćanje izolata s 30 °C na 20 °C (30/20 °C) u razdoblju od dva tjedna dao nam je pokazatelj stope mortaliteta izolata koja je iznosila 30.3%, odnosno 5.5% za hrvatske izolate i 60% za belgijske izolate. Stope rasta drastično su se povećale za izolate na 30/20 °C u odnosu na izolate koji su rasli na 20 °C, i iznosile su od 1.06 – 9.14 puta više nego kod 20 °C u istom periodu motrenja (Slika 34).



Slika 33. Prosječan rast izolata pri različitim temperaturama u periodu od 14 dana

Figure 33. Average growth of isolates on different temperatures in 14 days period



Slika 34. Prosječan rast izolata na 30/20 °C u usporedbi s rastom izolata na 20 °C

Figure 34. Average growth of isolates on 30/20 °C in comparison to growth on 20 °C

Iz grafa (Slika 33) možemo iščitati da određeni izolati nemaju mogućnost rasta pri temperaturi od 10 °C i niže, a ti izolati su Čazma K3, Čazma K23, Brinje L2, Ivanščica L3, Ivanščica L5, Delnice L3.1, te belgijski izolati Soulmes 1I, Soulmes 2I, Soulmes 1II, Chevetogne A i Rulles 2IIpet.

Za testiranje dviju nezavisnih grupa (Hrvatska i Belgija) pri temperaturi rasta od 10 °C najprije smo testirali normalnost distribucije koja je pokazala da nema normalnosti ( $p < 0.05$ ). S obzirom da nema normalnosti koristili smo neparametrijski Mann-Whitney U test koji mjeri razliku između dvije skupine nezavisnih mjerenja koji je pokazao da nema statistički značajne razlike između hrvatskih i belgijskih izolata u rastu na temperaturi od 10 °C (Tablica 22; Slika 35; Slika 38).

Testiranje dviju nezavisnih grupa (Hrvatska i Belgija) za temperaturu rasta pri 20 °C napravili smo pri istom principu gdje je test normalnosti distribucije pokazao da Hrvatska nema normalnu distribuciju ( $p < 0.05$ ), a Belgija ima ( $p > 0.05$ ) (Tablica 23). Dalje smo koristili neparametrijski Mann-Whitney U test koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika u rastu izolata između Hrvatske i Belgije. Hrvatski izolati na temperaturi od 20 °C rasli su brže od belgijskih izolata (Tablica 23; Slika 36; Slika 40).

Tablica 22. Test normalnosti i Mann Whitney U test za temperature od 10 °C

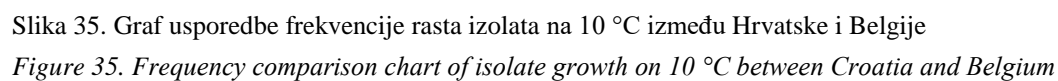
Table 22. Normality test and Mann Whitney U test for 10 °C temperature

Test normalnosti distribucije							Nezavisni uzorci Mann-Whitney U Test sažetak		
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk				
	Zemlja	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.		
Growth_10	1	0,208	54	0,000	0,804	54	0,000	Total N	99
	2	0,241	45	0,000	0,858	45	0,000	Mann-Whitney U	1168,000
								Wilcoxon W	2203,000
								Test Statistic	1168,000
								Standard Error	137,790
								Standardized Test Statistic	-0,341
								Asymptotic Sig. (2-sided test)	0,733

a. Lilliefors Significance Correction

Sažetak testa hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Growth_10 is the same across categories of Zemlja.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,733	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0.05.





Tablica 23. Test normalnosti i Mann Whitney U test za temperature od 20 °C

Table 23. Normality chart and Mann Whitney U test for 20 °C temperature

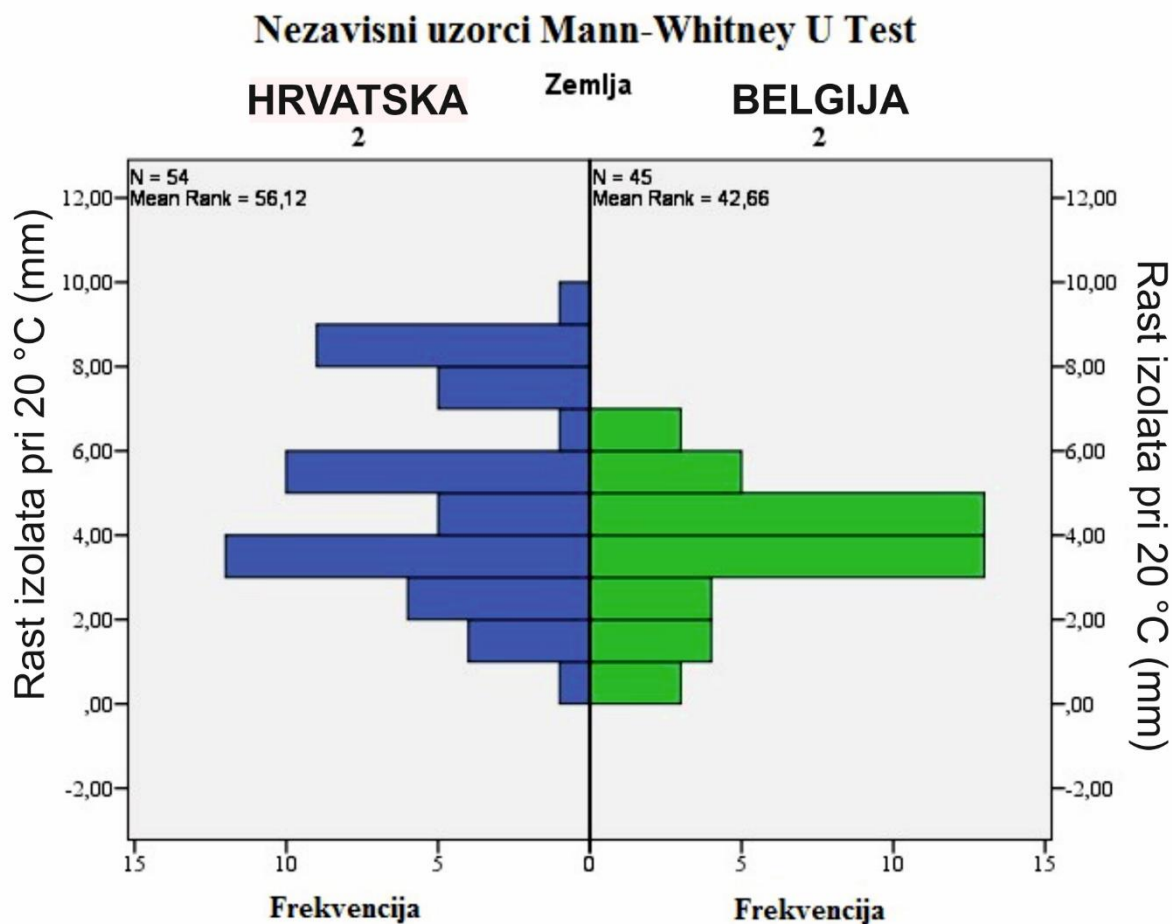
Tests normalnosti distribucije							
	Zemlja	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Growth_20	1	0,122	54	0,044	0,942	54	0,011
	2	0,127	45	0,068	0,963	45	0,162

a. Lilliefors Significance Correction

Sažetak testa hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Growth_20 is the same across categories of Zemlja.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,020	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

Nezavisni uzorci Mann-Whitney U Test sažetak	
Total N	99
Mann-Whitney U	884,500
Wilcoxon W	1919,500
Test Statistic	884,500
Standard Error	142,276
Standardized Test Statistic	-2,323
Asymptotic Sig.(2-sided test)	0,020



Slika 36. Graf usporedbe frekvencije rasta izolata na 20 °C između Hrvatske i Belgije

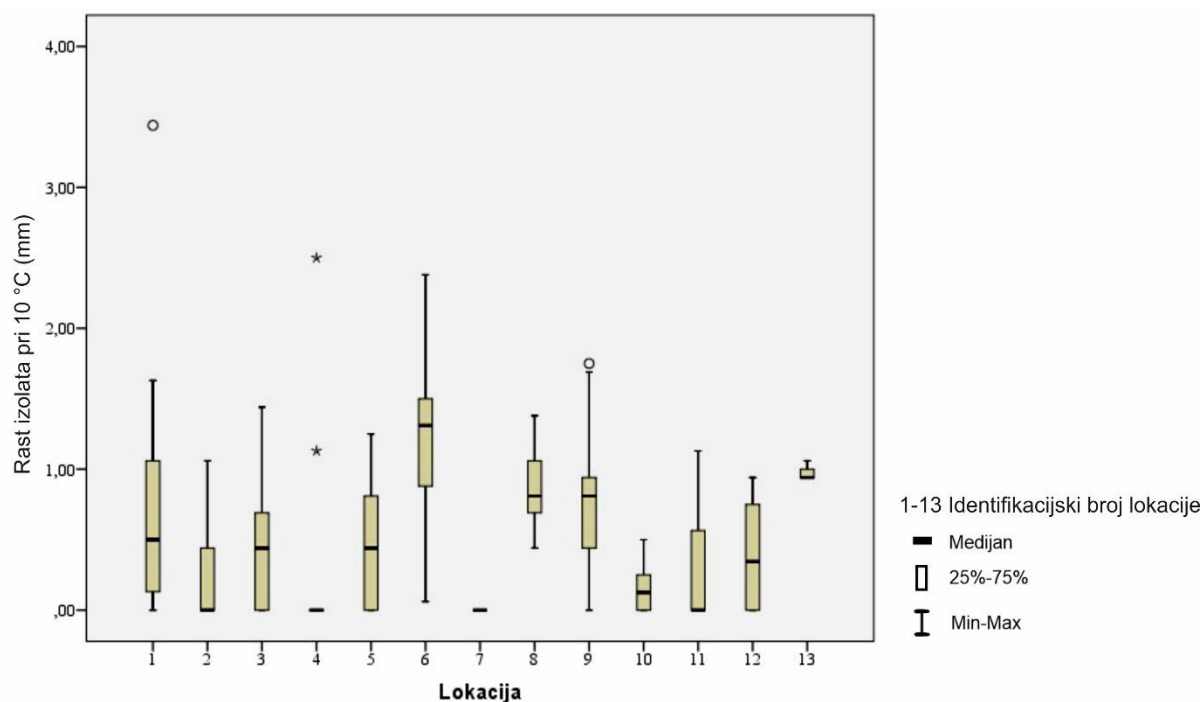
Figure 36. Frequency comparison chart of isolate growth on 20 °C between Croatia and Belgium

Za određivanje postoje li statistički značajne razlike između rasta izolata po grupiranim lokacijama na 10 °C, testirali smo najprije normalnost distribucije Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da je dio lokacija normalno distribuiran, a dio nije. Imamo mali broj uzoraka (u nekim lokacijama je 3 i 6) pa smo koristili test koji utvrđuje razliku između više skupina nezavisnih mjerenja, a to je Kruskal-Wallis test. Kruskal-Wallis test utvrdio je da postoje statistički značajne razlike u rastu izolata prema lokacijama, na temperaturi od 10 °C,  $X^2(2)=38.657$ ,  $p=0.000$ . Post-hoc Dunn-Bonferroni pokazao je statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ) između lokacija 2-6 (Čazma – Vrbanjske šume), 7-6 (Soulmes – Vrbanjske šume) i 7-8 (Soulmes – Nafraiture) što potvrđuje i distribucija rasta (Slika 37). Budući da lokacija 7 (Soulmes) ima vrijednost nula, odnosno izolati te lokacije pri temperaturi od 10 °C nisu rasli, tu se vrijednost ne može uzimati u obzir. Međutim distribucija rasta (Slika 37) jasno pokazuje razliku između lokacija 13-10 (Floriffoux – Chevetogne), ta se razlika nije ukazala u statističkoj obradi podataka zbog upotrebe neparametrijskog testa s vrlo malim brojem podataka.

Distribucija rasta svih izolata (Slika 38) jasno ukazuje da izolat 7 (Brinje L2) i izolat 13 (Delnice L3.1) imaju najmanji rast te se razlikuju od većine izolata, dok izolati 3 (Jasenovac 42C), 10 (Ivanščica L1), 16 (Vrbanjske šume 91B.1), 17 (Vrbanjske šume 91B.2) i 26 (Gembloux 1III) ukazuju na najveću stopu rasta pri temperaturi od 10 °C.

Za određivanje postoji li statistički značajne razlike između rasta izolata po grupiranim lokacijama na 20 °C, također smo testirali normalnost distribucije Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao na normalnu distribuciju, međutim zbog malog broja uzoraka ponovno smo koristili Kruskal-Wallis test koji je utvrdio da postoji statistički značajna razlika u rastu izolata među lokacijama. Post-hoc Dunn-Bonferroni pokazao je statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ) između lokacija 7-1 (Soulmes – Nova Gradiška), 7-3 (Soulmes – Brinje), 7-6 (Soulmes – Vrbanjske šume), 7-8 (Soulmes – Nafraiture) što potvrđuje i distribucija rasta (Slika 39). Međutim distribucija rasta (Slika 39) jasno pokazuje razliku između lokacije 7 (Soulmes) i gotovo svih ostalih lokacija, ali neke se razlike nisu ukazale u statističkoj obradi podataka zbog upotrebe neparametrijskog testa s vrlo malim brojem podataka.

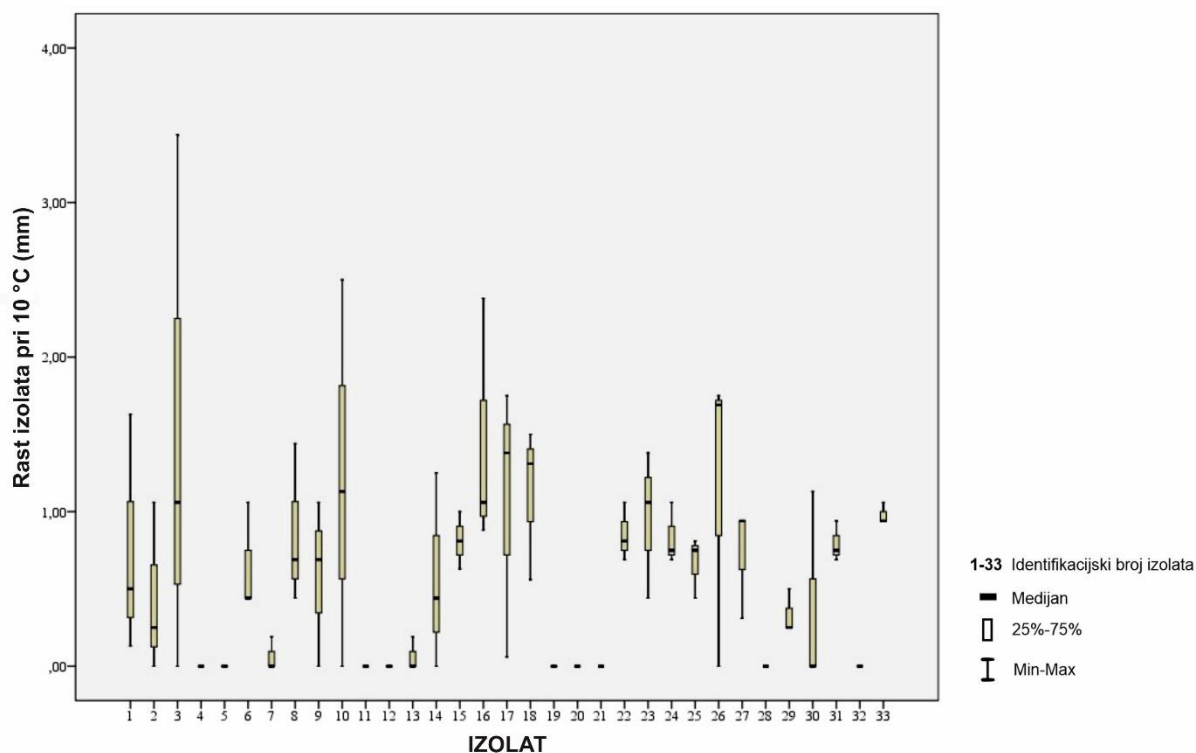
Distribucija rasta svih izolata (Slika 40) jasno ukazuje da izolat 19 (Soulmes 1I) i 20 (Soulmes 2I) imaju najmanji rast te se razlikuju od ostalih izolata, dok izolati 2 (Nova Gradiška K1), 5 (Čazma K23), 8 (Brinje L3), 9 (Brinje L4), 16 (Vrbanjske šume 91B.1) i 17 (Vrbanjske šume 91B.2) ukazuju na najveću stopu rasta pri temperaturi od 20 °C.



Legenda: 1- Lipovljani 199G-Nova Gradiška K1-Jasenovac 42C; 2-Čazma K3-Čazma K23-Čazma K40; 3-Brinje L2-Brinje L3-Brinje L4; 4-Ivanščica L1-Ivanščica L3-Ivanščica L5; 5-Delnice L3.1-Zalesina L3.2-Vrbovsko L1; 6-Vrbanjske šume 91B.1-Vrbanjske šume 91B.2-Vrbanjske šume 91B.3; 7-Soulmes 1I-Soulmes 2I-Soulmes 1II; 8-Nafrature 1I-Nafrature 3I-Nafrature P; 9-Gembloux N2-Gembloux 1III-Gembloux 7II; 10-Chevetogne A-Chevetogne 4II; 11-Heer 3II; 12-Rulles 1IIF-Rulles 2II; 13-Flouriffoux 3I

Slika 37. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* na temperaturi od 10 °C grupiranih prema lokaciji

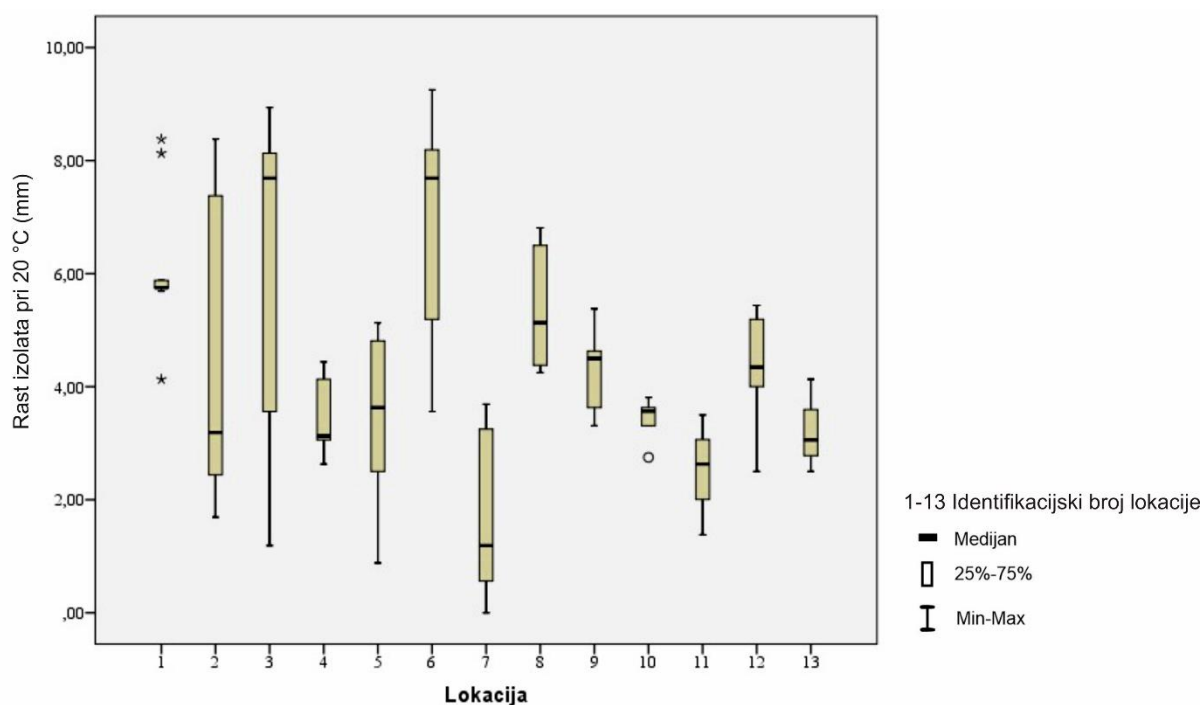
Figure 37. Distribution of fungus *H. fraxineus* isolate growth on 10 °C temperature grouped by the location



Legenda: 1- Lipovljani 199G; 2-Nova Gradiška K1; 3-Jasenovac 42C; 4-Čazma K3; 5-Čazma K23; 6-Čazma K40; 7-Brinje L2; 8-Brinje L3; 9-Brinje L4; 10-Ivanščica L1; 11-Ivanščica L3; 12-Ivanščica L5; 13-Delnice L3.1; 14-Zalesina L3.2; 15-Vrbovsko L1; 16-Vrbanjske šume 91B.1; 17-Vrbanjske šume 91B.2; 18-Vrbanjske šume 91B.3; 19-Soulmes 1I; 20-Soulmes 2I; 21-Soulmes 1II; 22-Nafrature 1I; 23-Nafrature 3I; 24-Nafrature P; 25-Gembloux N2; 26-Gembloux 1III; 27-Gembloux 7II; 28-Chevetogne A; 29-Chevetogne 4II; 30-Heer 3II; 31-Rulles 1IIF; 32-Rulles 2II; 33-Flouriffoux 3I

Slika 38. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* na temperaturi od 10 °C

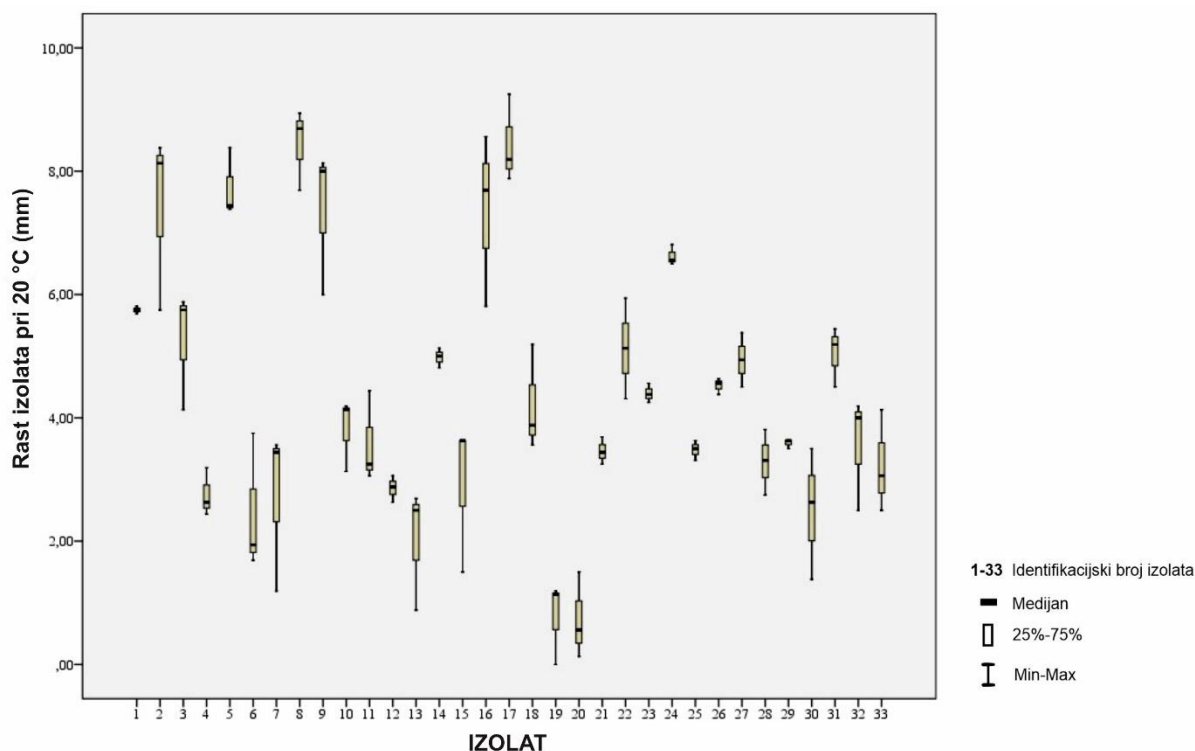
Figure 38. Distribution of fungus *H. fraxineus* isolate growth on 10 °C temperature



Legenda: 1- Lipovljani 199G-Nova Gradiška K1-Jasenovac 42C; 2-Čazma K3-Čazma K23-Čazma K40; 3-Brinje L2-Brinje L3-Brinje L4; 4-Ivanščica L1-Ivanščica L3-Ivanščica L5; 5-Delnice L3.1-Zalesina L3.2-Vrbovsko L1; 6-Vrbanjske šume 91B.1-Vrbanjske šume 91B.2-Vrbanjske šume 91B.3; 7-Soulmes 1I-Soulmes 2I-Soulmes 1II; 8-Nafraiture 1I-Nafraiture 3I-Nafraiture P; 9-Gembloux N2-Gembloux 1III-Gembloux 7II; 10-Chevetogne A-Chevetogne 4II; 11-Heer 3II; 12-Rulles 1IIF-Rulles 2II; 13-Flouriffoux 3I

Slika 39. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* pri temperaturi od 20 °C grupiranih prema lokaciji

Figure 39. Distribution of fungus *H. fraxineus* isolate growth on 20 °C temperature grupe by the location



Legenda: 1- Lipovljani 199G; 2-Nova Gradiška K1; 3-Jasenovac 42C; 4-Čazma K3; 5-Čazma K23; 6-Čazma K40; 7-Brinje L2; 8-Brinje L3; 9-Brinje L4; 10-Ivanščica L1; 11-Ivanščica L3; 12-Ivanščica L5; 13-Delnice L3.1; 14-Zalesina L3.2; 15-Vrbovsko L1; 16-Vrbanjske šume 91B.1; 17-Vrbanjske šume 91B.2; 18-Vrbanjske šume 91B.3; 19-Soulmes 1I; 20-Soulmes 2I; 21-Soulmes 1II; 22-Nafrature 1I; 23-Nafrature 3I; 24-Nafrature P; 25-Gembloux N2; 26-Gembloux 1III; 27-Gembloux 7II; 28-Chevetogne A; 29-Chevetogne 4II; 30-Heer 3II; 31-Rulles 1IIF; 32-Rulles 2II; 33-Flouriffoux 3I

Slika 40. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* pri temperaturi od 20 °C

Figure 40. Distribution of fungus *H. fraxineus* isolate growth on 20 °C temperature

### 3.2.3. Molekularne analize izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

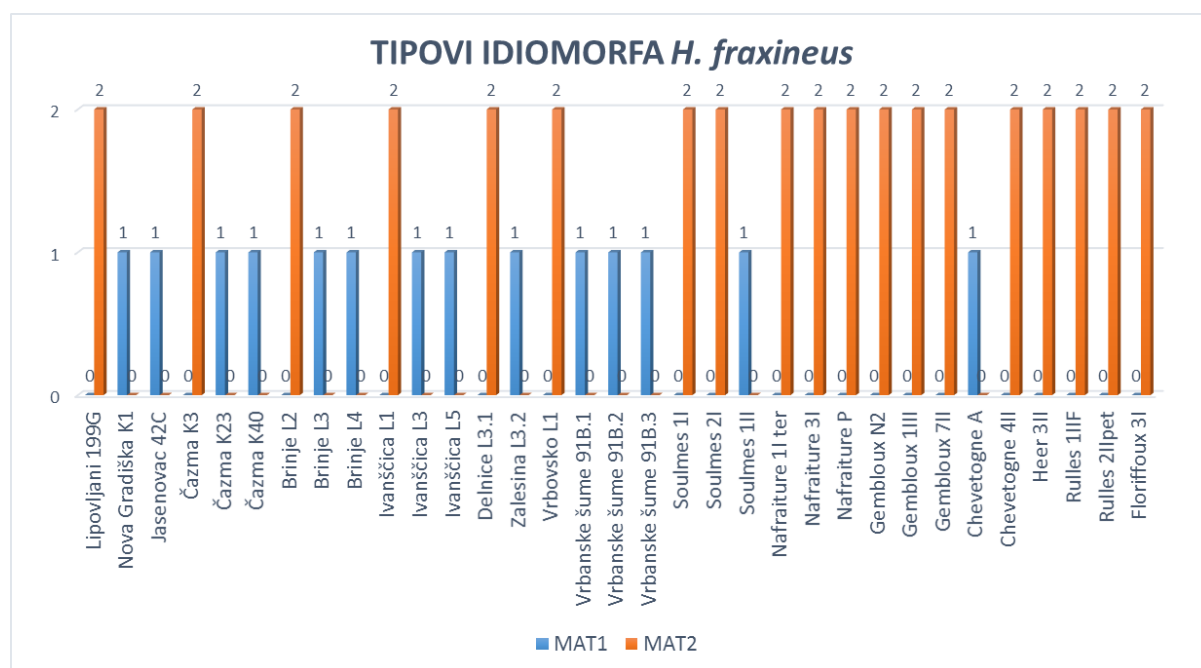
#### DNA ekstrakcija izolata *Hymenoscyphus fraxineus* i Real Time qPCR za detekciju patogena

DNA ekstrakti su kvantificirani na spektrofotometru i razrijeđeni na vrijednosti od 1 ng/μl za daljnju upotrebu (Tablica 49). Protokol za upotrebu qPCR-a u dokazivanju identiteta patogena *H. fraxineus*, razrađen u CRAW istraživačkom centru (Chandelier et al. 2010) (Slika 81), upotrebljen je za određivanje identiteta patogena, za kvantifikaciju ekstrahirane DNA (bazirano na Ct vrijednostima praga), te za potvrđivanje neprisutnosti DNA kontaminacije prilikom DNA ekstrakcijskog postupka (Slika 80). Potvrđen je identitet svih 33 izolata kao gljivični patogen *H. fraxineus* gdje su vrijednosti amplificirane ITS regije genoma rDNA

specifične za tu vrstu amplificirane iznad Ct vrijednosti praga (Tablica 49). Baze početnice amplificirale su 81 bp fragment DNA koji je specifičan samo za vrstu *H. fraxineus*, ne i za druge vrste roda *Hymenoscyphus* ili *Chalara* ili druge vrste gljiva povezanih s jasenom.

### Određivanje idiomorfa odabranih izolata

Za određivanje polimorfizma odnosno idiomorfa MAT1 ili MAT2 gljive *H. fraxineus*, fragmenti SLA2 i APN2 gena su amplificirani u totalnom volumenu reakcije od 20 µl sukladno protokolu (Gross et al. 2012) upotrebom 5 ng DNA. Produkti amplifikacije HP\_MAT1 nalaze se na 1207 bp, a produkti amplifikacije CF\_HMG nalaze se na 571 bp (u prilogu Tablica 48). Protokol identifikacije idiomorfa je prikazan (u prilogu Slika 82). Na taj način određeni su idiomorfi za sva 33 izolata (Slika 41). Idiomorf Hf\_MAT1 bio je zastupljeniji kod hrvatskih izolata (66.7%), dok je većina belgijskih izolata pripadala idiomorfu Hf\_MAT2 (86.7%).

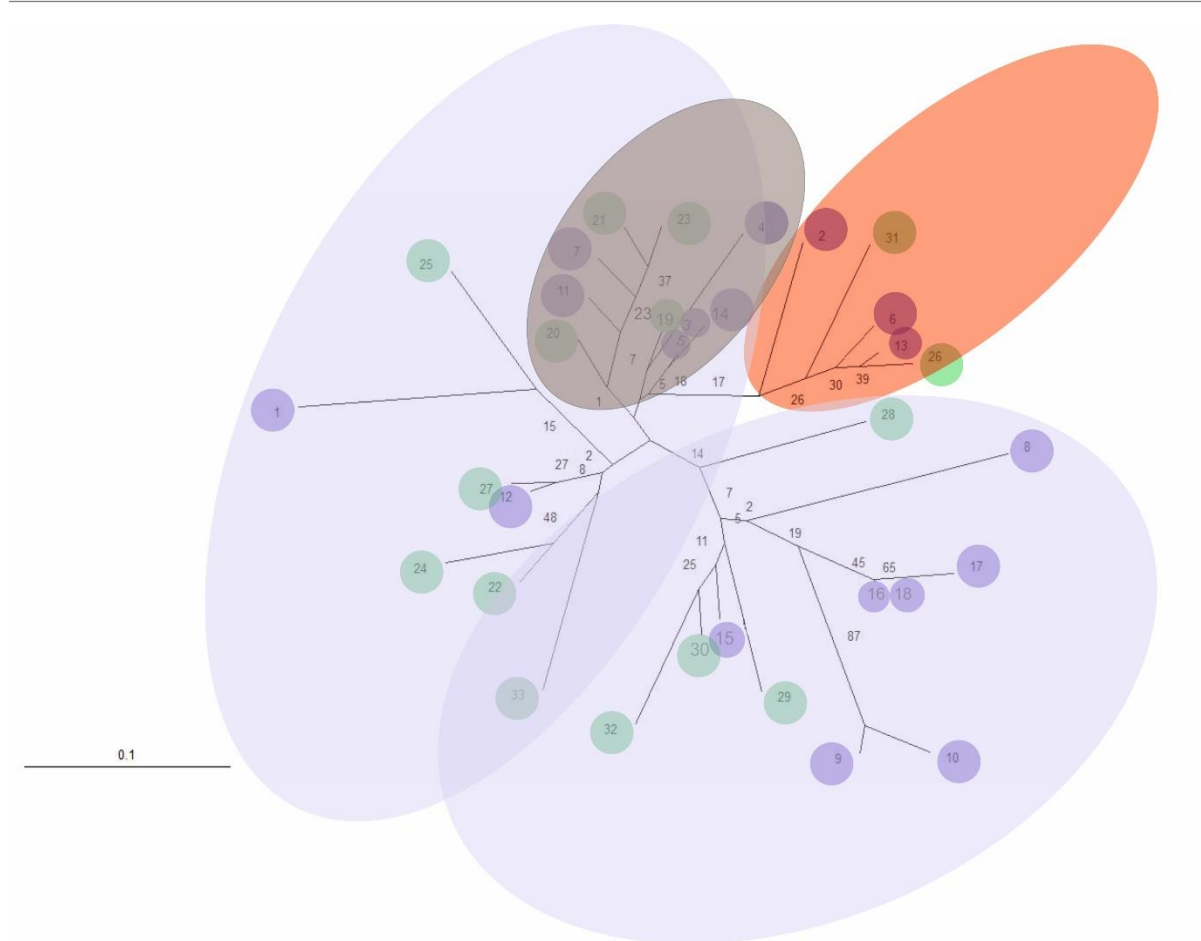


Slika 41. Tipovi idiomorfa gljive *H. fraxineus* (MAT1; MAT2) kod izabranih izolata za molekularne analize  
Figure 41. Mating types of fungus *H. fraxineus* (MAT1; MAT2) of selected isolates for molecular analyses



### **Genetska analiza *Hymenoscyphus fraxineus* izolata s RAMS bazama početnicama**

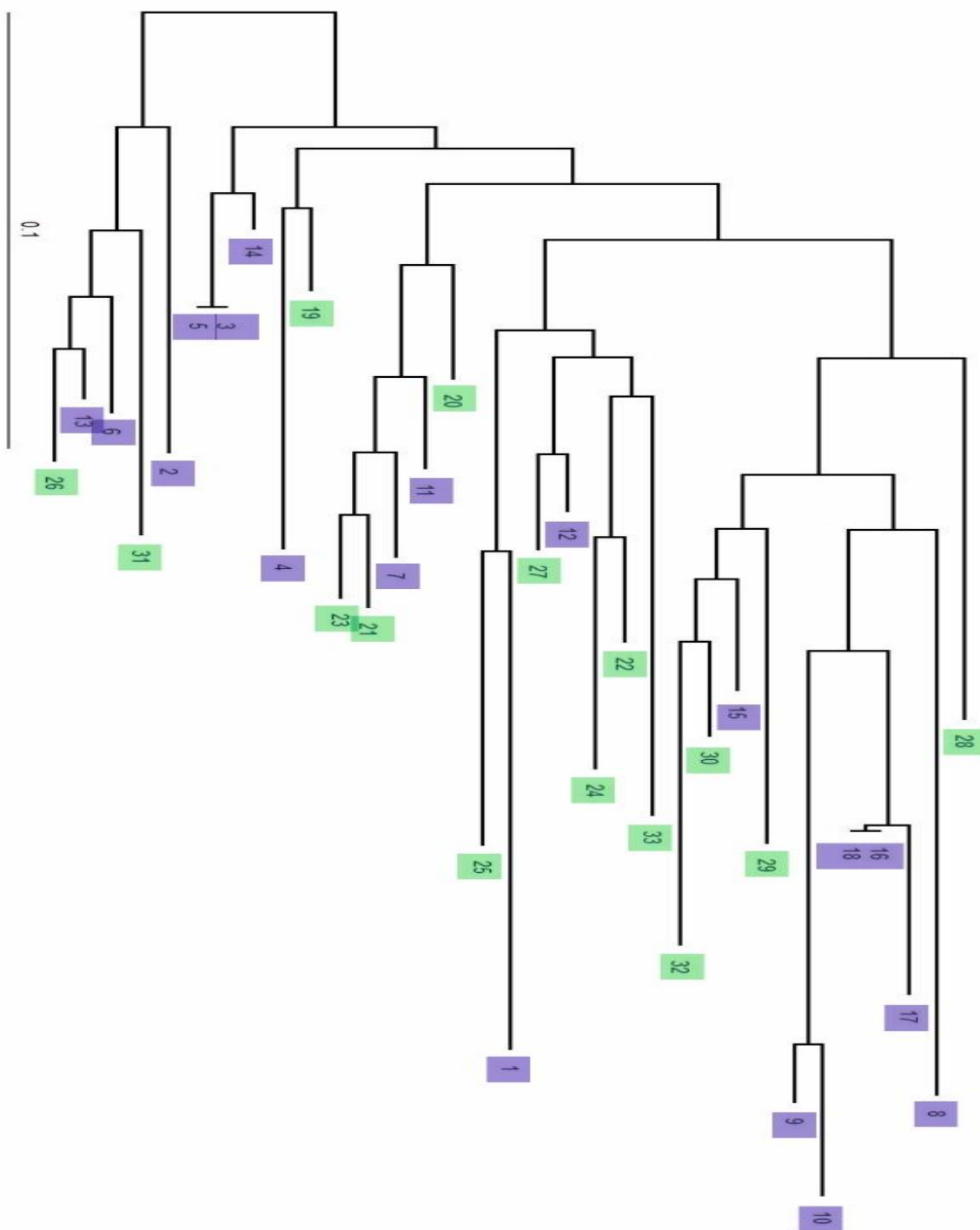
Genetska varijabilnost 33 izolata *H. fraxineus* (18 hrvatskih i 15 belgijskih) je determinirana upotrebom 6 RAMS baza početnica [DHB(CGA)5, DHB(ATG)5, BDB(ACA)5, DHB(AGC)5, CCTT, DBV(CAT)5] prema publikacijama (Kraj & Kowalski 2014; Kraj et al. 2012; Rytönen et al. 2011). Između 6 procijenjenih RAMS baza početnica, 2 RAMS baze početnice nisu upotrijebljene u genetskoj analizi. Jedna od njih [DHB(CGA)5] nije bila polimorfična, dok druga [CCTT] nije amplificirala signal fragmenata niti nakon spuštanja temperature naližavanja tijekom PCR amplifikacije. Stoga je samo 4 RAMS baza početnica upotrijebljeno za genetsku analizu što odgovara 17 markera dobivenih za prvotnu analizu komponenata i AMOVA test). Analiza je otkrila dvije odnosno tri populacije koje nisu povezane s geografskim podrijetlom izolata (Hrvatska, Belgija) niti s stopom rasta izolata pri temperaturi od 10 i 20 °C. Obradom podataka s FreeTree softverom za analizu genetskih podataka i konstrukciju stabla prema filogenetskim (Neighbor-joining) analizama, te provedbom univerzalnih reuzorkovanih tehnika (Bootstrapping 1000x) konstruirali smo unrooted i filigram stabla koji nam pokazuju dvije glavne populacije odnosno čak i do sedam subpopulacija. Unrooted i filigram stablo konstruirano je prema filogenetskoj (Neighbor-joining) metodi, te reuzorkovano (bootstrapping) 1000x (Slika 42; Slika 43). Oba stabla pokazuju dvije glavne populacije, odnosno više subpopulacija ovisno do koje razine želimo postaviti granice populacija.



Legenda: 1- Lipovljani 199G; 2-Nova Gradiška K1; 3-Jasenovac 42C; 4-Čazma K3; 5-Čazma K23; 6-Čazma K40; 7-Brinje L2; 8-Brinje L3; 9-Brinje L4; 10-Ivanščica L1; 11-Ivanščica L3; 12-Ivanščica L5; 13-Delnice L3.1; 14-Zalesina L3.2; 15-Vrbovsko L1; 16-Vrbanjske šume 91B.1; 17-Vrbanjske šume 91B.2; 18-Vrbanjske šume 91B.3; 19-Soulmes 1I; 20-Soulmes 2I; 21-Soulmes 1II; 22-Nafrature 1I; 23-Nafrature 3I; 24-Nafrature P; 25-Gembloux N2; 26-Gembloux 1III; 27-Gembloux 7II; 28-Chevetogne A; 29-Chevetogne 4II; 30-Heer 3II; 31-Rulles 1IIF; 32-Rulles 2II; 33-Flouriffoux 3I

Slika 42. Unrooted filogenetsko stablo izrađeno prema Neighbor-joining metodi (Bootstrapping 1000x)

Figure 42. Unrooted phylogenetic tree charted according the Neighbor-joining method (Bootstrapping 1000x)



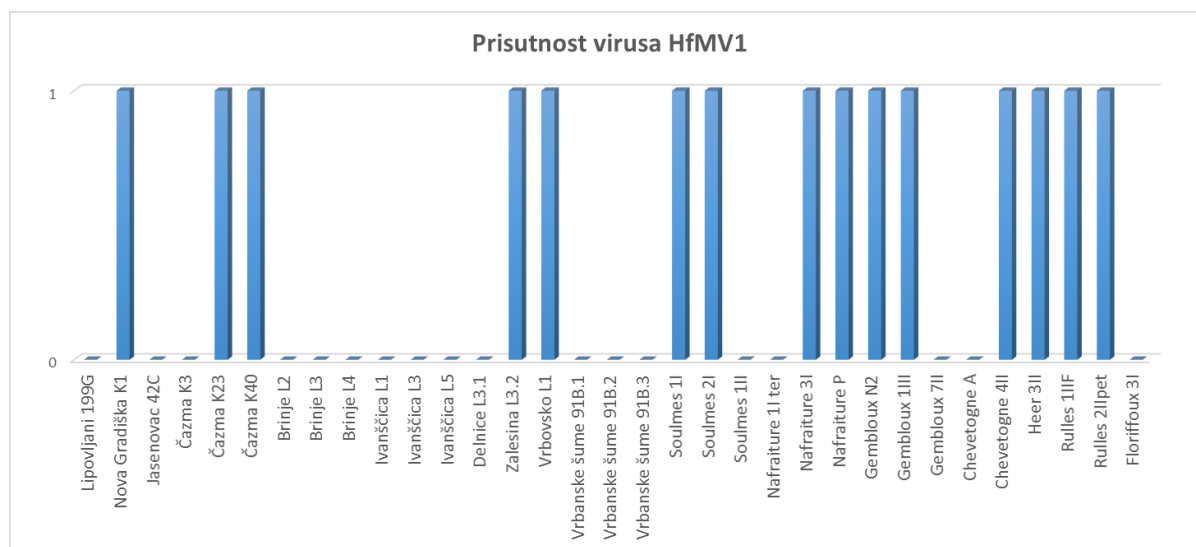
Legenda: 1- Lipovljani 199G; 2-Nova Gradiška K1; 3-Jasenovac 42C; 4-Čazma K3; 5-Čazma K23; 6-Čazma K40; 7-Brinje L2; 8-Brinje L3; 9-Brinje L4; 10-Ivanščica L1; 11-Ivanščica L3; 12-Ivanščica L5; 13-Delnice L3.1; 14-Zalesina L3.2; 15-Vrbovsko L1; 16-Vrbanjske šume 91B.1; 17-Vrbanjske šume 91B.2; 18-Vrbanjske šume 91B.3; 19-Soulmes 1I; 20-Soulmes 2I; 21-Soulmes 1II; 22-Nafrature 1I; 23-Nafrature 3I; 24-Nafrature P; 25-Gembloux N2; 26-Gembloux 1III; 27-Gembloux 7II; 28-Chevetogne A; 29-Chevetogne 4II; 30-Heer 3II; 31-Rulles 1IIF; 32-Rulles 2II; 33-Flouriffoux 3I

Slika 43. Filogram stablo izrađeno prema Neighbor-joining metodi (Bootstrapping 1000x)

Figure 43. Phylogram tree charted according the Neighbor-joining method (Bootstrapping 1000x)

### Testiranje prisutnosti mitovirusa HfMV1 u izolatima *Hymenoscyphus fraxineus*

Da bi se utvrdila rasprostranjenost odnosno prisutnost virusa u izolatima, Upotrebljavali smo protokole (Slika 84; Slika 85; Slika 86) utvrđene istraživanjem (Schoebel et al. 2014). Upotrijebili smo početnice Cf4\_F1 i Cf4\_R3 prema protokolu te promatrali dobivene vrijednosti amplifikacije. Za izradu procjene prisutnosti RNA za amplifikaciju, u ovoj kontrolnoj PCR amplifikaciji jedan od aktin-specifičnih početnica prelazi preko intron–exon granice što omogućuje specifičnu amplifikaciju aktin cDNA (izvedenu iz aktin mRNA) od *H. fraxineus* (Tablica 4). Uzorak se smatrao mitovirus pozitivnim ako je producirao i virus-specifične (511 bp) i aktin-specifične PCR produkte (300 bp), te mitovirus negativan ako je producirao samo aktin-specifične PCR produkte (300 bp). Sukladno dobivenim rezultatima mitovirus HfMV1 pozitivno bilo je 27.7% hrvatskih i 66.7% belgijskih izolata (Slika 44).



Slika 44. Prisutnost mitovirusa HfMV1 u izabranim izolatima gljive *H. fraxineus* za molekularne analize

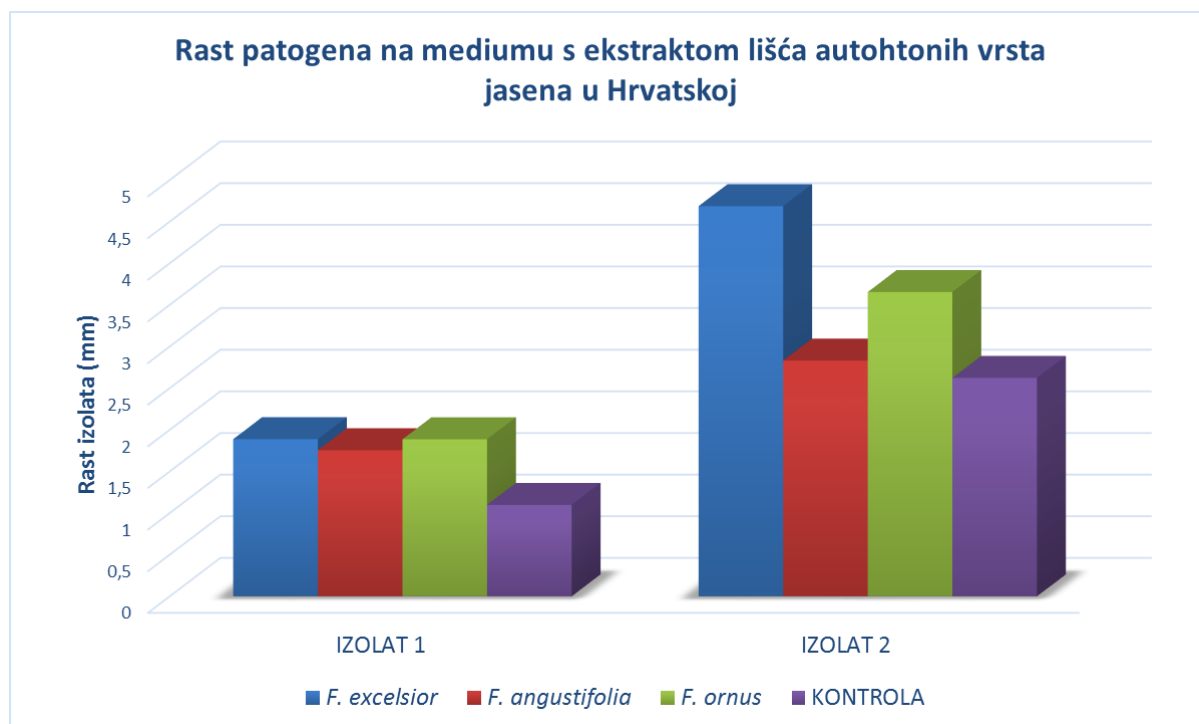
Figure 44. Presence of the mitovirus HfMV1 in selected isolates of fungus *H. fraxineus* for molecular analyses

### 3.2.4. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća *Fraxinus* spp.

Izolati patogena *H. fraxineus* uspješno su rasli na svim testiranim agar medijima s dodatkom ekstrakta lišća pojedinih vrsta jasena, kao i u kontroli, bez dodatka ekstrakta lišća jasena. Morfologija micelija varirala je u skladu s tipom agar mediuma (Kirisits et al. 2013), ali je korelirala s opisnim karakteristikama micelija u drugim istraživanjima (Kowalski 2006).

Ekstrakti lišća jasena utjecali su na varijacije u rastu izolata na svakom pojedinom mediju. Varijabilnost rasta izolata unutar svakog agar mediuma je izražena koeficijentom varijacije (CV) koji je relativno slab za oba izolata i za sve upotrijebljene medije, osim kod replika izolata 2 na agar mediumu s dodatkom ekstrakta lišća vrste *F. angustifolia* (Agar FA) (Slika 46).

S obzirom na stope rasta oba izolata, ako uzmemo u obzir agar medium (PDA Oxoid) obogaćen ekstraktima lišća jasena, najbrži rast ukazali su izolati na mediumu obogaćenim *F. excelsior* ekstraktom lišća, zatim slijedi medium s *F. ornus* lisnim ekstraktom, te najsporiji rast je zabilježen kod mediuma s *F. angustifolia* lisnim ekstraktom (Slika 45). Razlika u rastu je zbilježena i između izolata 1 i 2 na kontrolnom mediumu bez ekstrakta lista jasena, gdje je u slučaju izolata 1 rast bio značajno slabiji nego kod izolata 2. Rast kontrolnog izolata 1 također je bio najmanji rast u istraživanju. Svi izolati u istraživanju na svim tipovima hranidbene podloge s dodatkom ekstrakta lišća jasena pokazali su pojačani rast u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 45).



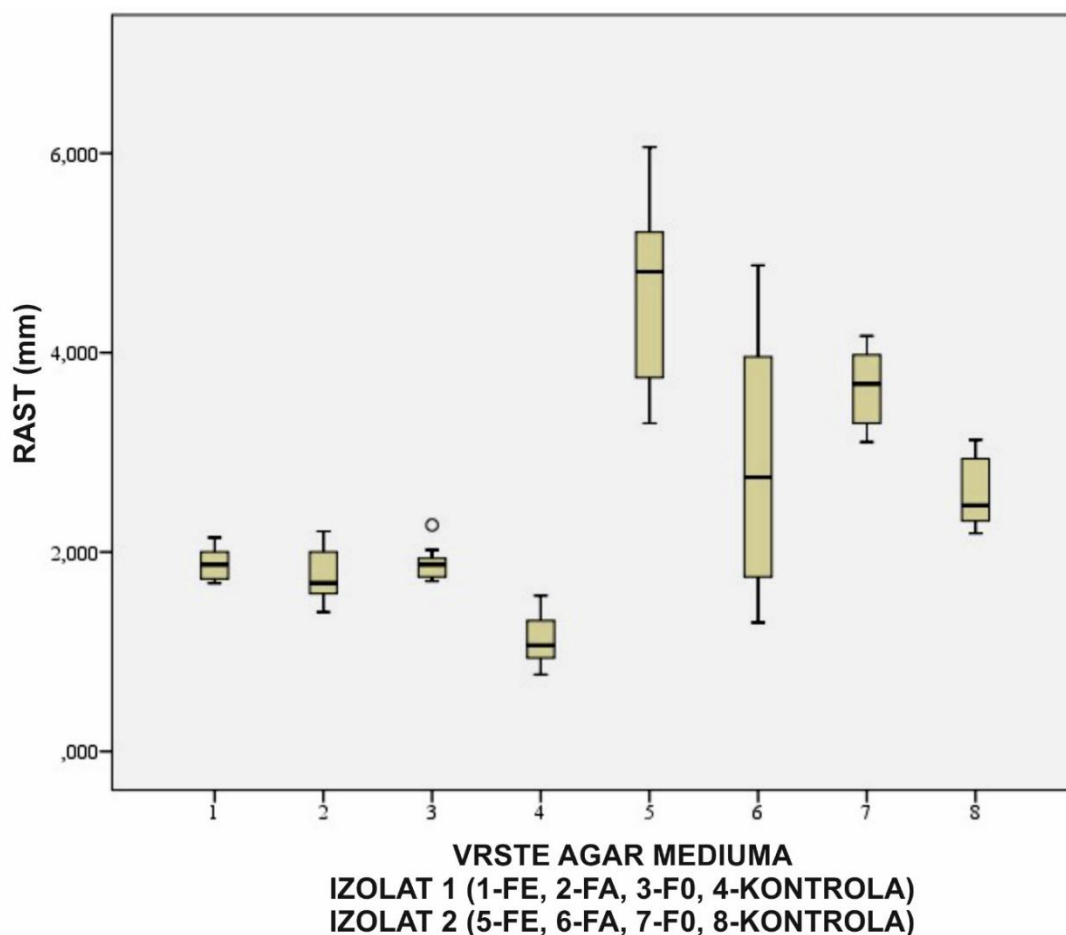
Slika 45. Rast izolata gljive *H. fraxineus* na različitim hranidbenim medijima s dodatkom ekstrakta lišća autohtonih vrsta jasena (*F. excelsior*, *F. angustifolia* i *F. ornus*), te kontrolna skupina bez dodatka ekstrakta lišća jasena u vremenskom periodu od 14 dana

Figure 45. The growth of *H. fraxineus* isolates on different agar mediums with leaf extracts of indigenous ash species (*F. excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus*) and control group without leaf extract additive in the time period of 14 days

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između agar mediuma s dodatkom ekstrakta lista jasena i kontrolne skupine za svojstvo rasta izolata 1 upotrijebili smo Wilcoxon Signed Ranks test (Tablica 24) koji je utvrdio da postoji statistički značajna razlika između rasta izolata 1 u kontrolnoj skupini i rasta izolata 1 na svim ostalim agar mediumima s dodatkom ekstrakta lišća. Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između rasta izolata 1 na pojedinim agar mediumima s dodatkom ekstrakta lista jasena upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Friedman ANOVA (Tablica 24) za zavisne uzorke koji je pokazao da nema statistički značajne razlike  $\chi^2(2) = 3.128$ ,  $p = 0.209$ .

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između agar mediuma s dodatkom ekstrakta lista jasena i kontrolne skupine za svojstvo rasta izolata 2 upotrijebili smo Wilcoxon Signed Ranks test (Tablica 24) koji je utvrdio da postoji statistički značajna razlika između rasta izolata 2 u kontrolnoj skupini i rasta izolata 2 na agar mediumu FE i FO s dodatkom ekstrakta lišća (*F. excelsior* i *F. ornus*). Nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine i agar mediuma FA (*F. angustifolia*). Što se može očitati i iz distribucije rasta izolata (Slika 46).

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između rasta izolata 2 na pojedinim agar mediumima s dodatkom ekstrakta lista jasena upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Friedman ANOVA (Tablica 24) za zavisne uzorke koji je pokazalo da postoji statistički značajna razlika  $\chi^2(2) = 11.744$ ,  $p = 0.003$ . Post hoc test Dunn-Bonferroni ukazao je između kojih agar mediuma postoji statistički značajna razlika za svojstvo rasta izolata 2, te je utvrđeno da se statistički razlikuje rast izolata 2 na mediumu FE (*Fraxinus excelsior*) i mediumu FA (*Fraxinus angustifolia*), te na mediumu FE i mediumu FO (*Fraxinus ornus*). Statistički se ne razlikuje medium FA i medium FO za svojstvo rasta izolata 2. Što se može očitati i iz distribucije rasta izolata (Slika 46).



Legenda: FE - *Fraxinus excelsior* medium; FA - *Fraxinus angustifolia* medium; FO – *Fraxinus ornus* medium

Slika 46. Distribucija rasta izolata na različitim tipovima agar mediuma s dodatkom ekstrakta lišća jasena (FE, FA, F0 i kontrola)

Figure 46. Distribution of isolate growth on different types of agar medium with leaf extracts of ash (FE, FA, FO and control)



Tablica 24. Rezultati statističke analize za rast izolata na različitim hranidbenim podlogama s ekstraktima lišća autohtonih vrsta jasena

Table 24. Results of statistical analysis for isolate growth on different agar mediums with leaf extracts of indigenous ash species

**USPOREDBA RASTA IZOLATA 1 NA POJEDINIM AGAR MEDIUMIMA S KONTROLOM (Test Statistics<sup>a</sup>)**

	kontrola – Agar FE	kontrola – Agar FA	kontrola – Agar FO
Z	-2,805 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,005	0,005	0,005

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

**RAZLIKA IZMEĐU RASTA IZOLATA 1 NA POJEDINIM AGAR MEDIUMIMA**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of agar FE1, agar FA2 and agar FO3 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	0,209	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,050.

**USPOREDBA RASTA IZOLATA 2 NA POJEDINIM AGAR MEDIUMIMA S KONTROLOM (Test Statistics<sup>a</sup>)**

	kontrola – Agar FE	kontrola – Agar FA	kontrola – Agar FO
Z	-2,803 <sup>b</sup>	-0,561 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,005	0,575	0,005

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

**RAZLIKA IZMEĐU RASTA IZOLATA 2 NA POJEDINIM AGAR MEDIUMIMA**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of agar FE1, agar FA2 and agar FO3 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	0,003	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,050.

**POST HOC DUNN-BONFERRONI**

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.
Agar FA – Agar FO	-0,350	0,447	-0,783	0,434	1,000
Agar FA - Agar FE	1,450	0,447	3,242	0,001	0,004
Agar FO - Agar FE	1,100	0,447	2,460	0,014	0,042

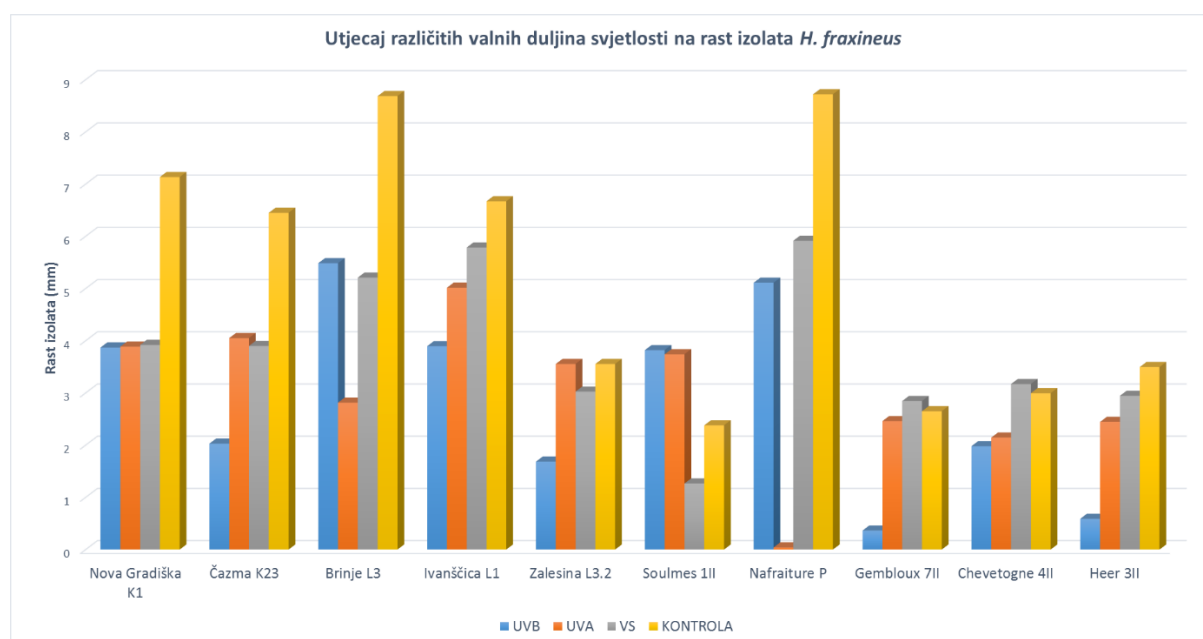
Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is 0,05.

### 3.2.5. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

#### Utjecaj UV svjetlosti na rast izolata gljive

Pregledom grafa koji prikazuje utjecaj različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast testiranih izolata gljive *H. fraxineus* (Slika 47), uočava se tendencija jačeg utjecaja UV svjetlosti s nižim valnim duljinama (UVB, UVA) dok je najmanji utjecaj redukcije rasta izolata imao vidljivi dio spektra UV svjetlosti. Tu tendenciju iskazuje većina izolata s iznimkom belgijskog izolata Soulmes 1II koji iskazuje najveću redukciju rasta upravo pod djelovanjem vidljivog spektra UV svjetlosti. Kao iznimka Također su belgijski izolati Gembloux 7II i Chevetogne 4II koji iskazuju blagi stimulirani rast pod djelovanjem vidljivog spektra UV svjetlosti u odnosu na kontrolu, svi ostali izolati pod djelovanjem bilo kojih valnih duljina UV svjetlosti iskazuju reducirani rast izolata.

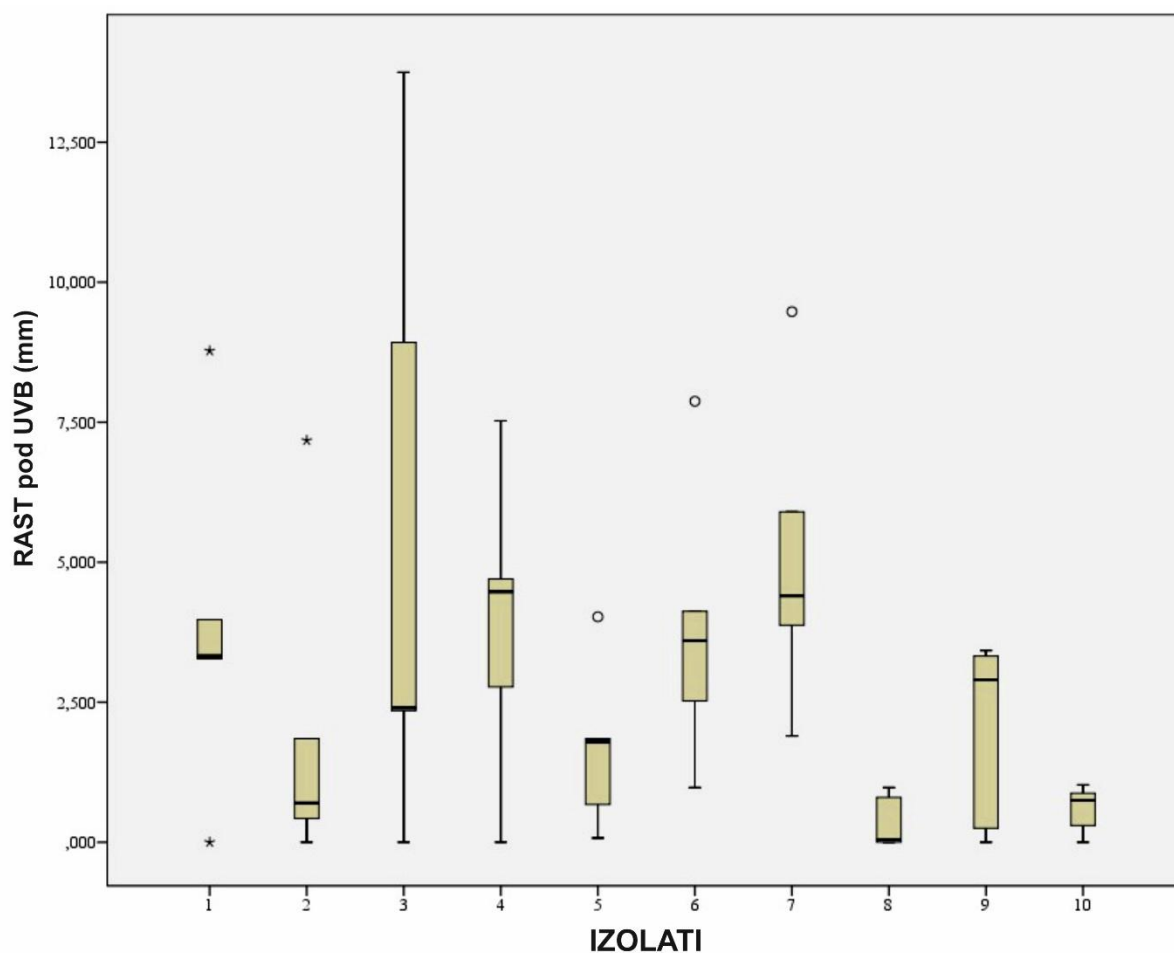


Slika 47. Utjecaj različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast kultura gljive *H. fraxineus* pri optimalnim uvjetima temperature od 20 °C u vremenskom periodu od 21 dan

Figure 47. Influence of different wave lengths of UV light on *H. fraxineus* culture growth under optimal 20 °C temperature in the time period of 21 days

Distribucijom rasta izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju UVB svjetlosti (Slika 48) prikazana je varijabilnost rasta izolata. Grafovi distribucije (boxplot) prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti, medijan i outliere odnosno vrijednosti koje odskaču iz skupine. Iz

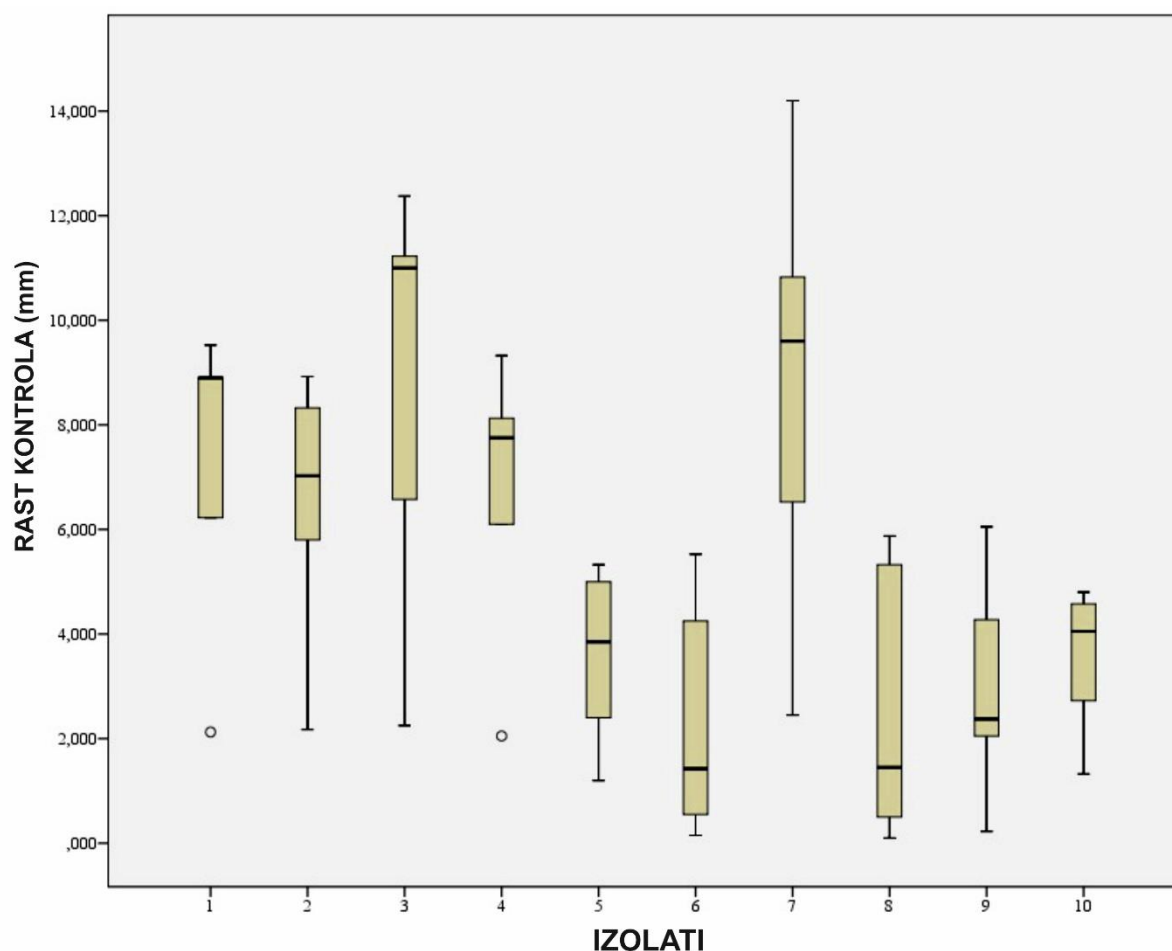
grafova distribucije rasta izolata pri UVB i distribucije rasta kontrolne skupine (Slika 49) može se iščitati da je varijabilnost obje skupine poprilično velika, te da rast pri UVB ima distribuciju nižih vrijednosti.



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes 1II; 7-Nafraiture P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 48. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem ultravioletnog UVB svjetla

Figure 48. Growth distribution of *H. fraxineus* isolates under ultraviolet UVB light treatment



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes III; 7-Nafraiture P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 49. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* u mraku bez utjecaja ultravioletnog svjetla  
Figure 49. Growth distribution of *H. fraxineus* isolates in dark without ultraviolet light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između rasta izolata pri djelovanju UVB svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H koji je utvrdio statistički značajne razlike u rastu između izolata  $\chi^2(9) = 17.288$ ,  $p = 0.044$  (Tablica 25). Da bi se utvrdilo između kojih lokacija postoji statistički značajna razlika upotrebljen je Post-hoc test Dunn-Bonferroni. Dunn test je utvrdio da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između pojedinih lokacija (8-1, 8-3, 8-4, 8-6, 8-7, 10-6, 10-7 i 2-7), međutim uvrštavanjem Bonferroni korekcije utvrđeno je da je Dunn test bio lažno pozitivan te da nema signifikantne razlike između lokacija (izolata). Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na rast pod djelovanjem UVB svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ )

Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da nema normalnosti distribucije niti za Hrvatsku niti za Belgiju (Tablica 25). Mann-Whitney U test nije pokazao statistički značajne razlike ( $p=0.448$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na rast izolata pod djelovanjem UVB svjetlosti (Tablica 25). Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između rasta izolata pod djelovanjem UVB svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ) između rasta pod UVB svjetlošću i kontrole za izolate broj 8 i 10, što je vidljivo i iz distribucije rasta izolata (Slika 48; Slika 49) gdje se vidi da su najveću redukciju rasta pod UVB svjetlom pretrpili izolati 8 (Gembloux 7II) i 10 (Heer 3II).

Tablica 25. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem UVB svjetla

Table 25. Results of statistical analysis for isolate growth under ultraviolet UVB light treatment

Sažetak testne hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVB_rast is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,044	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

Test normalnosti distribucije							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UVB_rast	1 HRV	0,165	25	0,076	0,858	25	0,002
	2 BEL	0,221	25	0,003	0,846	25	0,001

a. Lilliefors Significance Correction

Sažetak testne hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVB_rast is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,448	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

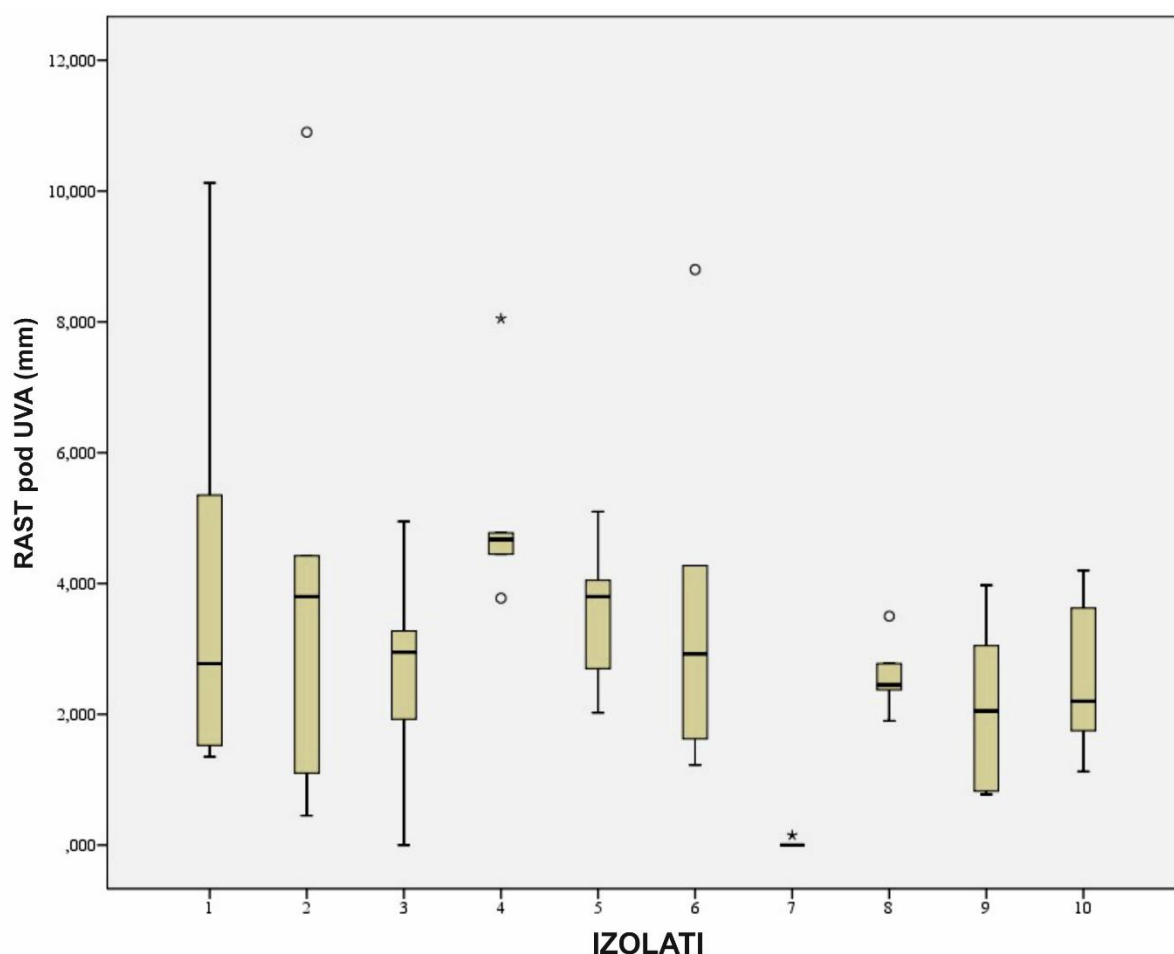
Usporedba UVB lokacija s kontrolnim lokacijama (Test Statistics <sup>a</sup> )										
	Loc1_k - Loc1	Loc2_k - Loc2	Loc3_k - Loc3	Loc4_k - Loc4	Loc5_k - Loc5	Loc6_k - Loc6	Loc7_k - Loc7	Loc8_k - Loc8	Loc9_k - Loc9	Loc10_k - Loc10
Z	-1,483 <sup>b</sup>	-1,753 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-1,753 <sup>b</sup>	-1,483 <sup>b</sup>	-0,944 <sup>c</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-2,023 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-2,023 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,138	0,080	0,225	0,080	0,138	0,345	0,225	0,043	0,225	0,043

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

Distribucijom rasta izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju UVA svjetlosti (Slika 50) prikazana je varijabilnost rasta izolata, koja se može usporediti s zavisnom kontrolnom skupinom (Slika 49). Iz grafova distribucije rasta izolata pri UVA i rasta kontrolne skupine možemo iščitati da je kontrolna skupina varijabilnija, te da rast pri UVA ima ujednačeniju distribuciju i nižih vrijednosti. Iz distribucije se također može iščitati da najbržerastući izolati u kontrolnoj skupini su najviše bili potisnuti odnosno reducirani pod djelovanjem UVA svjetlosti (3-Brinje L3 i 7-Nafraiture P).



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes 1II; 7-Nafraiture P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 50. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem ultravioletnog UVA svjetla  
Figure 50. Growth distribution of *H. fraxineus* isolates under ultraviolet UVA light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između rasta izolata pri djelovanju UVA svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H koji je utvrdio statistički značajne razlike u rastu između izolata  $\chi^2(9) = 19.594$ ,  $p = 0.021$  (Tablica 26). Da bi se utvrdilo između kojih lokacija postoji statistički značajna razlika upotrebljen je Post-hoc test Dunn-Bonferroni koji je utvrdio da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između 7-4.

Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na rast pod djelovanjem UVA svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da nema normalnosti distribucije niti za Hrvatsku niti za Belgiju (Tablica 26). Mann-Whitney U test pokazao je statistički značajne razlike ( $p = 0.007$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na rast izolata pod djelovanjem UVA svjetlosti (Tablica 26).

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između rasta izolata pod djelovanjem UVA svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između rasta pod UVA svjetlošću i kontrole za izolate broj 3 i 7, što je vidljivo i iz distribucije rasta izolata (Slika 50; Slika 49) gdje se vidi da najveću redukciju rasta pod UVA pretrpili izolati 3 (Brinje L3) i 7 (Nafraiture P) koji su u kontroli i najbrže rasli.



Tablica 26. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem UVA svjetla

Table 26. Results of statistical analysis for isolate growth under ultraviolet UVA light treatment

Sažetak testne hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVA_rast is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,021	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

Test normalnosti distribucije							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UVA_rast	1 HRV	0,177	25	0,042	0,903	25	0,021
	2 BEL	0,126	25	0,200 <sup>*</sup>	0,870	25	0,004

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVA_rast is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,007	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

Usporedba UVA lokacija s kontrolnim lokacijama

Test Statistics <sup>a</sup>	Loc1_k - Loc1	Loc2_k - Loc2	Loc3_k - Loc3	Loc4_k - Loc4	Loc5_k - Loc5	Loc6_k - Loc6	Loc7_k - Loc7	Loc8_k - Loc8	Loc9_k - Loc9	Loc10_k - Loc10
Z	-1,214 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-2,023 <sup>b</sup>	-0,944 <sup>b</sup>	-0,405 <sup>c</sup>	-0,674 <sup>c</sup>	-2,023 <sup>b</sup>	-0,135 <sup>c</sup>	-0,944 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed) (p<0.05)	0,225	0,225	0,043	0,345	0,686	0,500	0,043	0,893	0,345	0,225

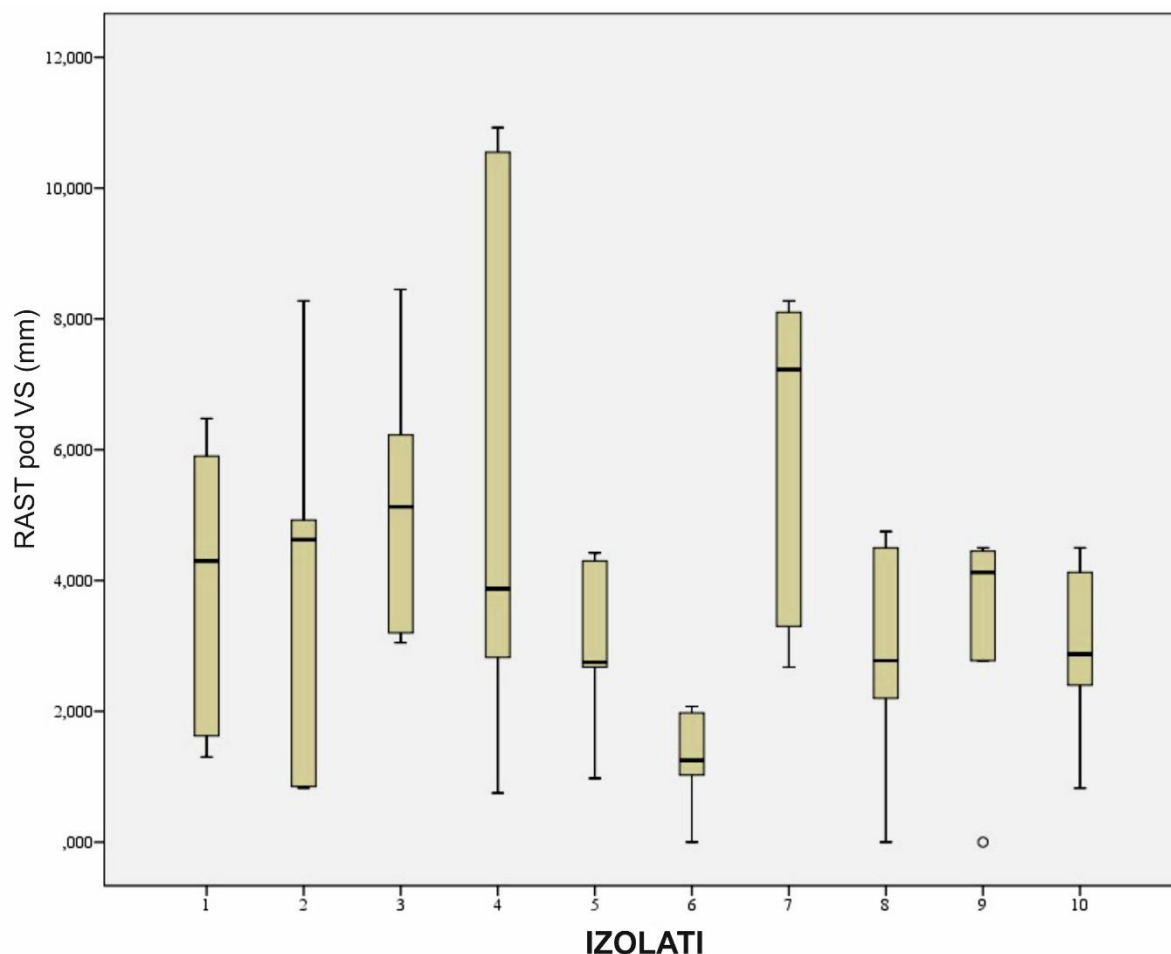
a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

Distribucijom rasta izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju VS svjetlosti (Slika 51) prikazana je varijabilnost rasta izolata, koja se može usporediti s zavisnom kontrolnom skupinom (Slika 49). Iz grafova distribucije rasta izolata pri VS i rasta kontrolne skupine možemo iščitati da je varijabilnost velika i kod kontrolne skupine i kod skupine pod VS svjetlom, te da rast pri VS svjetlosti ima najmanju redukciju vrijednosti od svih ostalih UV skupina.

Iz distribucije se također može iščitati da VS reducira reducira rast izolata u manjoj mjeri od ostalih skupina UV svjetla, međutim redukcija je kontinuirana u svim izolatima osim dva belgijska izolata broj 8 (Gembloux 7II) i 9 (Chevetogne 4II) u kojima ima blagi stimulativni efekt (Slika 47). Također kod izolata 6 ima jači redukcijski efekt od UVB i UVA svjetla, kod izolata 5 jači redukcijski efekt od UVA, te kod izolata 3 jači redukcijski efekt od UVB svjetla.



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes III; 7-Nafraiture P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 51. Distribucija rasta izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem vidljivog djela spektra VS svjetla  
Figure 51. Growth distribution of *H. fraxineus* isolates under visible spectrum VS light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između rasta izolata pri djelovanju VS svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H koji je utvrdio da nema statistički značajne razlike u rastu između izolata  $\chi^2(9) = 12.755$ ,  $p = 0.174$  (Tablica 27). Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na rast pod djelovanjem VS svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao je distribucija normalna i Levenov test je ukazao na homogenost distribucije za Hrvatsku i za Belgiju (Tablica 27). Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlike ( $p < 0.05$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na rast izolata pod djelovanjem VS svjetlosti koristili smo t-test za nezavisne uzorke koji je ukazao da nema

statistički značajne razlike između populacija [ $t(48)=1.540$ ,  $p=0.130$ ] (Tablica 27). Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između rasta izolata pod djelovanjem VS svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao da nema statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ). Redukcija rasta izolata smanjuje se s povećavanjem valnih duljina UV svjetlosti, stoga je za očekivati da je vidljivi spektar najbliži kontrolnim vrijednostima, te da su se izolati evolucijski bolje prilagodili na te valne duljine i da je njihova tolerantnost ovog spektra veća (Slika 47).

Tablica 27. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem VS svjetla

Table 27. Results of statistical analysis for isolate growth under visible spectrum VS light treatment

Sažetak testne hipoteze				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of VS_rast is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,174	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

Test normalnosti distribucije							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VS_rast	1 HRV	0,117	25	0,200 <sup>*</sup>	0,925	25	0,065
	2 BEL	0,134	25	0,200 <sup>*</sup>	0,930	25	0,087

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

t-test nezavisnih uzoraka										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
VS_rast	Equal variances assumed	0,934	0,339	1,540	48	0,130	1,140000	0,740224	-0,348319	2,628319
	Equal variances not assumed			1,540	45,609	0,130	1,140000	0,740224	-0,350337	2,630337

Usporedba VS lokacija s kontrolnim lokacijama (Test Statistics <sup>a</sup> )										
	Loc1_k - Loc1	Loc2_k - Loc2	Loc3_k - Loc3	Loc4_k - Loc4	Loc5_k - Loc5	Loc6_k - Loc6	Loc7_k - Loc7	Loc8_k - Loc8	Loc9_k - Loc9	Loc10_k - Loc10
Z	-1,214 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-1,483 <sup>b</sup>	-0,674 <sup>b</sup>	-0,674 <sup>b</sup>	-0,674 <sup>b</sup>	-1,214 <sup>b</sup>	-0,405 <sup>c</sup>	-0,405 <sup>c</sup>	-0,944 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,225	0,225	0,138	0,500	0,500	0,500	0,225	0,686	0,686	0,345

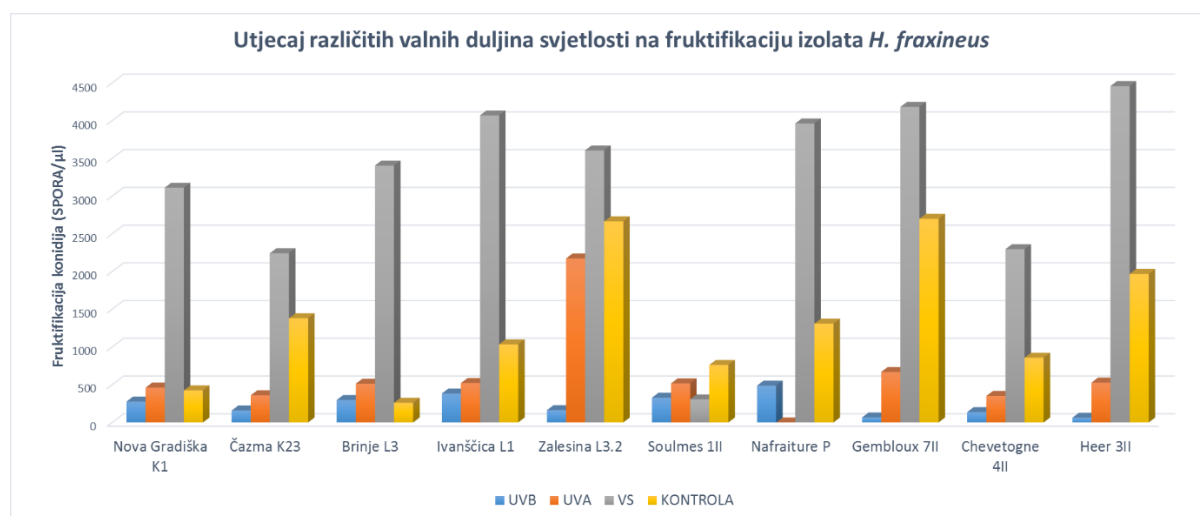
a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

## Utjecaj UV svjetlosti na fruktifikaciju izolata gljive

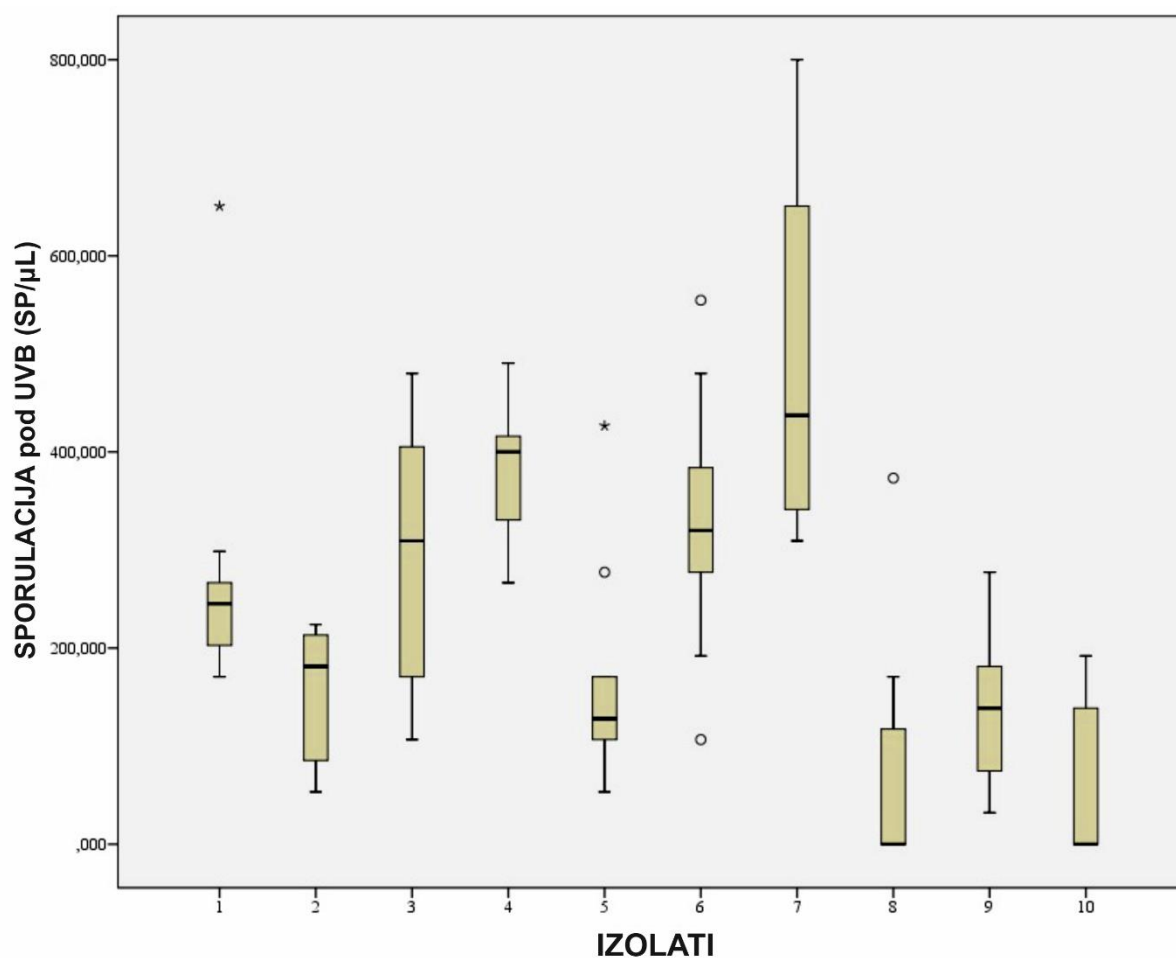
Upotrebom različitih spektara UV svjetlosti utvrđeno je da niže valne duljine (UVB i UVA) imaju reduksijski utjecaj na fruktifikaciju izolata gljive *H. fraxineus*, osim laganog porasta fruktifikacije kod izolata Nova Gradiška K1 i Brinje L3 pod djelovanjem UVA spektra svjetlosti (Slika 52). Više valne duljine VS svjetlosti kod svih izolata osim izolata Soulmes 1II izazvale su povećanje fruktifikacije izolata (Slika 52).



Slika 52. Utjecaj različitih valnih duljina UV svjetlosti na fruktifikaciju (sporulaciju) kultura gljive *H. fraxinus* pri optimalnim uvjetima temperature od 20 °C u vremenskom periodu od 21 dan

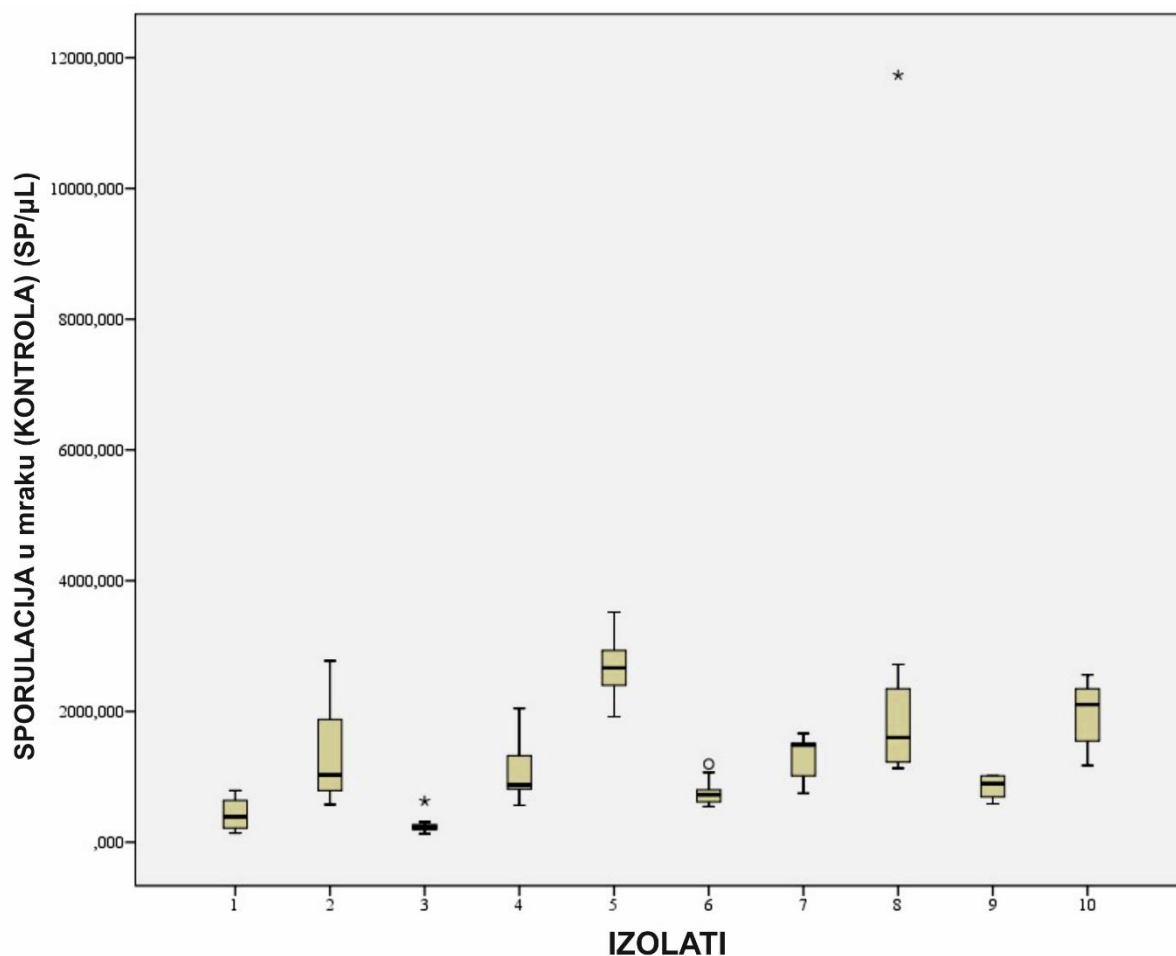
Figure 52. Influence of different wave lengths of UV light on fructification (sporulation) of *H. fraxineus* cultures under optimal 20 °C temperature conditions in the time period of 21 days

Distribucijom fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju UVB svjetlosti (Slika 53) prikazana je varijabilnost fruktifikacije izolata. Grafovi distribucije (boxplot) prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti, medijan i outliere odnosno vrijednosti koje odskaču iz skupine. Iz grafova distribucije fruktifikacije izolata pri UVB i distribucije rasta kontrolne skupine (Slika 54) možemo iščitati da je varijabilnost obje skupine poprilično velika, te da fruktifikacija pri UVB ima distribuciju nižih vrijednosti.



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes 1II; 7-Nafrature P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 53. Distribucija fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem ultravioletne UVB svjetlosti  
 Figure 53. Fructification distribution of *H. fraxineus* isolates under ultraviolet UVB light treatment



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes III; 7-Nafrature P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 54. Distribucija fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* u mraku bez utjecaja ultravioletnog svjetla  
Figure 54. Fructification distribution of *H. fraxineus* isolates in dark without ultraviolet light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između fruktifikacije izolata pri djelovanju UVB svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H koji je utvrdio statistički značajne razlike u rastu između izolata  $\chi^2(9) = 62.802$ ,  $p = 0.000$  (Tablica 28). Da bi se utvrdilo između kojih lokacija postoji statistički značajna razlika upotrebljen je Post-hoc test Dunn-Bonferroni koji je utvrdio da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između lokacija 10-3, 10-6, 10-4, 10-7, 8-3, 8-6, 8-4, 8-7, 9-4, 9-7, 5-4, 5-7 i 2-7. Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na fruktifikaciju pod djelovanjem UVB svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da za Hrvatsku postoji normalna distribucija, a da za Belgiju nema

normalnosti distribucije (Tablica 28). Mann-Whitney U test nije pokazao statistički značajne razlike ( $p=0.078$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVB svjetlosti (Tablica 28). Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između fruktifikacije izolata pod djelovanjem UVB svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ) između fruktifikacije pod UVB svjetlošću i kontrole za sve izolate osim izolata broj 1 i 3, što je vidljivo i iz prosječnih vrijednosti fruktifikacije izolata (Slika 52) gdje se vidi da su značajne redukcije fruktifikacije izolata pod UVB svjetlom prisutne gotovo na svim izolatima.

Tablica 28. Rezultati statističke analize za fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVB svjetla

Table 28. Results of statistical analysis for isolate fructification under ultraviolet UVB light treatment

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVB_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UVB_sporulacija	1 HRV	0,095	50	0,200 <sup>*</sup>	0,957	50	0,069
	2 BELG	0,148	50	0,008	0,894	50	0,000

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVB_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,078	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,050.

USPOREDBA UVB LOKACIJA S KONTROLNIM LOKACIJAMA (Test Statistics <sup>a</sup> )										
	Lok1_k - Lok1	Lok2_k - Lok2	Lok3_k - Lok3	Lok4_k - Lok4	Lok5_k - Lok5	Lok6_k - Lok6	Lok7_k - Lok7	Lok8_k - Lok8	Lok9_k - Lok9	Lok10_k - Lok10
Z	-0,969 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-0,765 <sup>c</sup>	-2,805 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,333	0,005	0,444	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

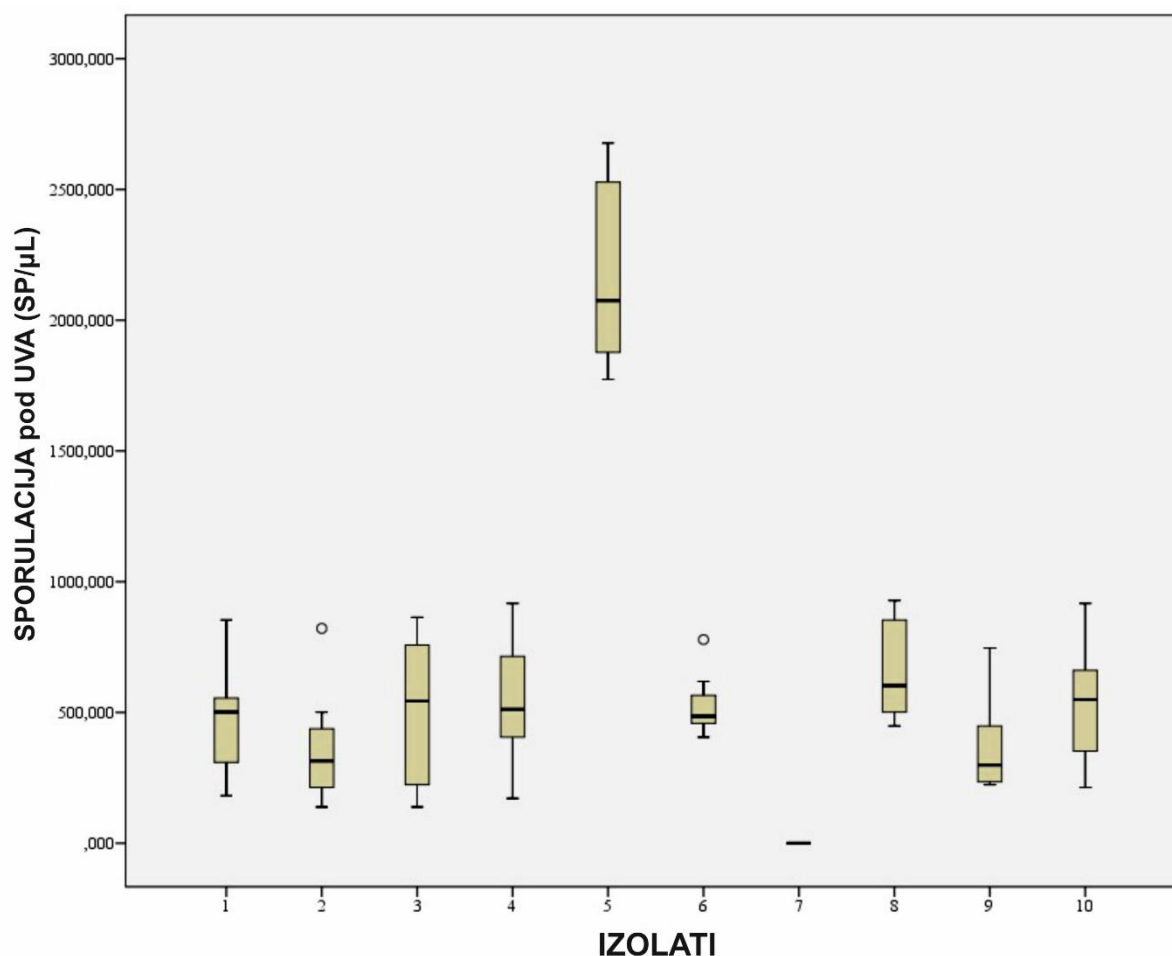
a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.



Distribucijom fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju UVA svjetlosti (Slika 55) prikazana je varijabilnost fruktifikacije izolata, koja se može usporediti s zavisnom kontrolnom skupinom (Slika 54). Iz grafova distribucije fruktifikacije izolata pri UVA i fruktifikacije kontrolne skupine možemo iščitati da je kontrolna skupina varijabilnija, te da fruktifikacija pri UVA ima ujednačeniju distribuciju i nižih vrijednosti.



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes 1II; 7-Nafrature P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 55. Distribucija fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem ultravioletne UVA svjetlosti  
Figure 55. Fructification distribution of *H. fraxineus* isolates under ultraviolet UVA light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između fruktifikacije izolata pri djelovanju UVA svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H koji je utvrdio statistički značajne razlike u fruktifikaciji između izolata  $\chi^2(9) = 59.288$ ,  $p = 0.000$  (Tablica 29).

Da bi se utvrdilo između kojih lokacija postoji statistički značajna razlika upotrebljen je Post-hoc test Dunn-Bonferroni koji je utvrdio da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između lokacija 7-1, 7-3, 7-4, 7-6, 7-10, 7-8, 7-5, 2-5, 9-5, 1-5 i 3-5. Lokacija 7 ima vrijednost nula (0) zbog toga jer nije fruktificirala pod UVA svjetlom, što je razlog zbog čega se značajno razlikuje od svih ostalih lokacija.

Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na fruktifikaciju pod djelovanjem UVA svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da nema normalnosti distribucije niti za Hrvatsku niti za Belgiju (Tablica 29). Mann-Whitney U test pokazao je statistički značajne razlike ( $p = 0.024$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVA svjetlosti (Tablica 29).

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između fruktifikacije izolata pod djelovanjem UVA svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između fruktifikacije pod UVA svjetlošću i kontrole za sve izolate osim izolata broj 1, što je vidljivo i iz prosječnih vrijednosti fruktifikacije izolata (Slika 52). Fruktifikacija izolata značajno je reducirana kod svih izolata osim izolata 1 (Nova Gradiška K1), te kod izolata 3 (Brinje L3) u kojem je UVA svjetlost potaknula statistički značajnu fruktifikaciju.

Tablica 29: Rezultati statističke analize za fruktifikaciju izolata pod djelovanjem UVA svjetla

Table 29. Results of statistical analysis for isolate fructification under ultraviolet UVA light treatment

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVA_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UVA_sporulacija	1 HRV	0,248	50	0,000	0,767	50	0,000
	2 BEL	0,134	50	0,026	0,940	50	0,014

a. Lilliefors Significance Correction

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of UVA_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,024	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

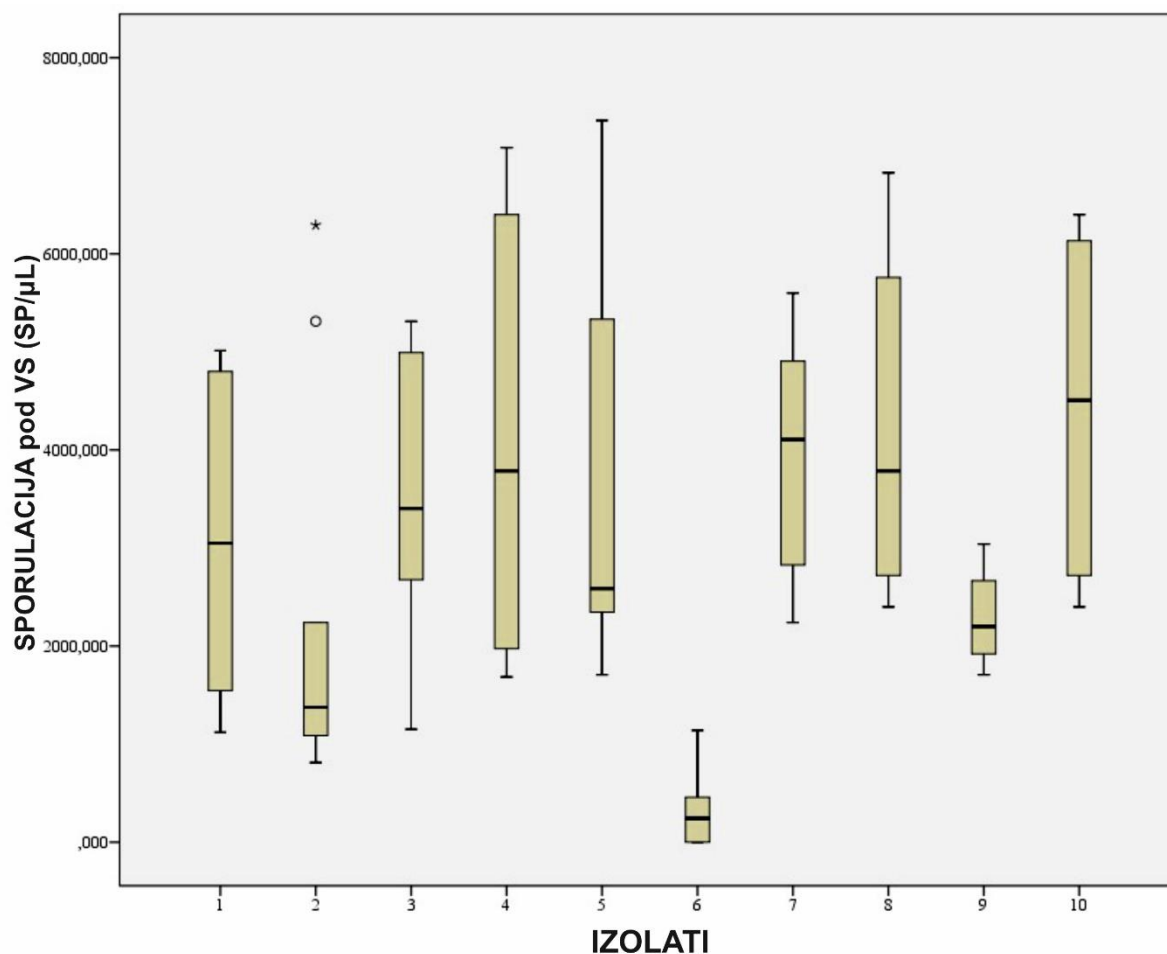
USPOREDBA UVA LOKACIJA S KONTROLNIM LOKACIJAMA (Test Statistics <sup>a</sup> )										
	Lok1_k - Lok1	Lok2_k - Lok2	Lok3_k - Lok3	Lok4_k - Lok4	Lok5_k - Lok5	Lok6_k - Lok6	Lok7_k - Lok7	Lok8_k - Lok8	Lok9_k - Lok9	Lok10_k - Lok10
Z	-0,051 <sup>b</sup>	-2,703 <sup>b</sup>	-2,142 <sup>c</sup>	-2,701 <sup>b</sup>	-2,295 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,701 <sup>b</sup>	-2,805 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,959	0,007	0,032	0,007	0,022	0,005	0,005	0,005	0,007	0,005

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

Distribucijom fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pri djelovanju VS svjetlosti (Slika 56) prikazana je varijabilnost fruktifikacije izolata, koja se može usporediti s zavisnom kontrolnom skupinom (Slika 54). Iz grafova distribucije fruktifikacije izolata pri VS i fruktifikacije kontrolne skupine možemo iščitati da je varijabilnost velika i kod kontrolne skupine i kod skupine pod VS svjetlom, te da su sve vrijednosti fruktifikacije pri VS svjetlosti povišene u odnosu na kontrolnu skupinu osim izolata 7 (Soulmes 1II). Iz distribucije se također može iščitati da VS ne reducira fruktifikaciju izolata kao ostale skupine UV svjetla osim izolata Soulmes 1II (Slika 54; Slika 56; Slika 52).



Legenda: 1-Nova Gradiška K1; 2-Čazma K23; 3-Brinje L3; 4-Ivanščica L1; 5-Zalesina L3.2; 6-Soulmes III; 7-Nafraiture P; 8-Gembloux 7II; 9-Chevetogne 4II; 10-Heer 3II

Slika 56. Distribucija fruktifikacije izolata gljive *H. fraxineus* pod djelovanjem vidljivog djela spektra VS svjetla  
Figure 56. Fructification distribution of *H. fraxineus* isolates under visible spectrum VS light treatment

Za testiranje postoji li statistički značajne razlike između fruktifikacije izolata pri djelovanju VS svjetlosti, upotrijebljen je Kruskal-Wallis H test koji je utvrdio statistički značajne razlike u fruktifikaciji između izolata  $\chi^2(9) = 42.440$ ,  $p = 0.000$  (Tablica 30). Da bi se utvrdilo između kojih lokacija postoji statistički značajna razlika upotrebljen je Post-hoc test Dunn-Bonferroni koji je utvrdio da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između lokacija 6-1, 6-5, 6-3, 6-4, 6-7, 6-8 i 6-10. Da bi testirali postoje li statistički značajne razlike između porijekla izolata (Hrvatska i Belgija) s obzirom na fruktifikaciju pod djelovanjem VS svjetla, testirali smo normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da Hrvatska ne pokazuje normalnu distribuciju, dok je Belgijska distribucija normalna (Tablica 30). Mann-

Whitney U test pokazao je da nema statistički značajne razlike ( $p=0.730$ ) između populacija (Hrvatska – Belgija) s obzirom na fruktifikaciju izolata pod djelovanjem VS svjetlosti (Tablica 30). Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između fruktifikacije izolata pod djelovanjem VS svjetlosti i kontrolnih izolata upotrebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je pokazao da ima statistički značajne razlike ( $p<0.05$ ) između svih izolata osim izolata 2, 5 i 8. Redukcija fruktifikacije izolata smanjuje se s povećavanjem valnih duljina UV svjetlosti, logično je zaključiti da su se izolati evolucijski bolje prilagodili na valne duljine vidljivog spektra, te da fotoreceptori na ove valne duljine reagiraju slanjem signala za hiperprodukciju spora zbog detekcije opasnosti od istrebljenja vrste (Slika 47).

Tablica 30. Rezultati statističke analize za rast izolata pod djelovanjem VS svjetla

Table 30. Results of statistical analysis for isolate growth under visible spectrum VS light treatment

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of VS_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Lokacija	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VS_sporulacija	1 HRV	0,166	50	0,001	0,915	50	0,002
	2 BEL	0,120	50	0,068	0,956	50	0,058

a. Lilliefors Significance Correction

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of VS_sporulacija is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,730	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

USPOREDBA VS LOKACIJE S KONTROLNOM LOKACIJOM (Test Statistics <sup>a</sup> )										
	Lok1_k - Lok1	Lok2_k - Lok2	Lok3_k - Lok3	Lok4_k - Lok4	Lok5_k - Lok5	Lok6_k - Lok6	Lok7_k - Lok7	Lok8_k - Lok8	Lok9_k - Lok9	Lok10_k - Lok10
Z	-2,803 <sup>b</sup>	-1,172 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,701 <sup>b</sup>	-1,173 <sup>b</sup>	-2,499 <sup>c</sup>	-2,805 <sup>b</sup>	-1,784 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>	-2,803 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,005	0,241	0,005	0,007	0,241	0,012	0,005	0,074	0,005	0,005

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

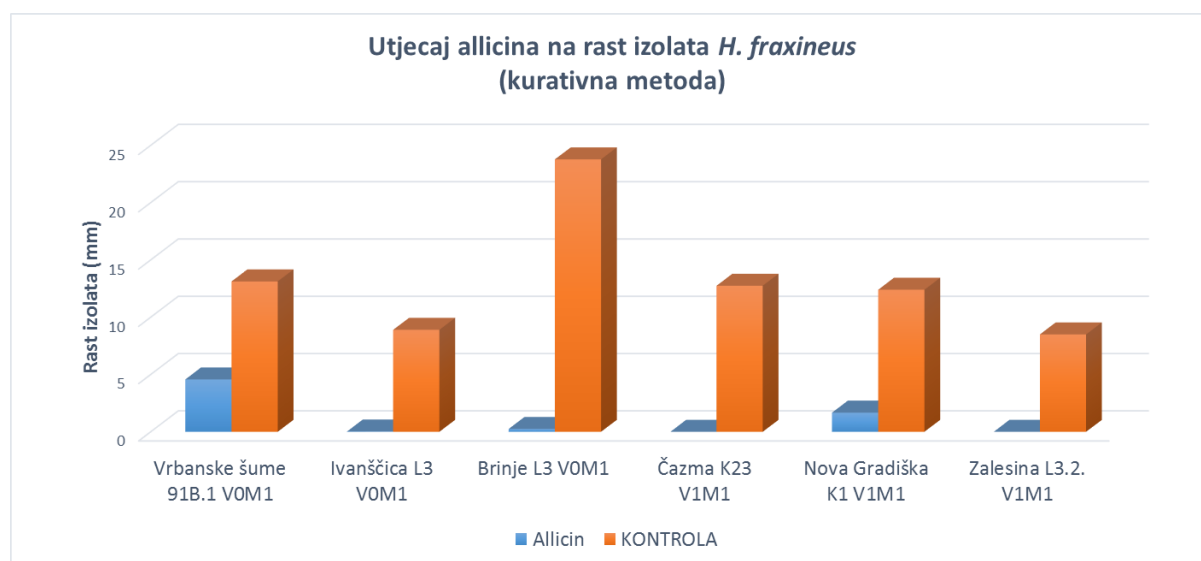
b. Based on positive ranks.

c. Based on negative ranks.

### 3.2.6. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus*

#### Kurativne metode suzbijanja patogena prskanjem Allicin sredstava zaštite direktno na micelij u petrijevu zdjelicu

Iz rezultata možemo utvrditi da kurativnim metodama primjene alternativnih sredstava nakon infekcije se može značajno reducirati rast patogena (Slika 57).



Slika 57. Utjecaj Allicina na rast izolata *H. fraxineus* kurativnim metodama suzbijanja patogena *in vitro* nakon 14 dana

Figure 57. Influence of Allicin on *H. fraxineus* isolate growth according to curative methods of pathogen suppression *in vitro* after 14 days

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između rasta tretiranih izolata i kontrolne grupe upotrijebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je utvrdio da kod svih izolata (Vrbanske šume 91B.1 V0M1, Ivanščica L3 V0M1, Brinje L3 V0M1, Čazma K23 V1M1, Nova Gradiška K1 V1M1, Zalesina L3.2 V1M1) se tretirani izolati statistički značajno razlikuju od kontrolne skupine (Slika 57).

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između djelotvornosti Allicina po svojstvu rasta izolata upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Kruskal-Wallis ANOVA za nezavisne uzorke koji je utvrdio statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između izolata  $\chi^2(5) = 41.091$ ,  $p = 0.000$ .

Da bi se utvrdilo izolati se međusobno statistički značajno razlikuju u rastu ( $p < 0.05$ ) nakon tretiranja Allicinom upotrijebljen je Post hoc Dunn-Bonferroni test koji je utvrdio razlike između izolata:

Čazma K23 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.000$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.000$ )

Čazma K23 V1M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.001$ )

Nova Gradiška K1 V1M1 - Zalesina L3.2 V1M1 ( $p = 0.001$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.010$ )

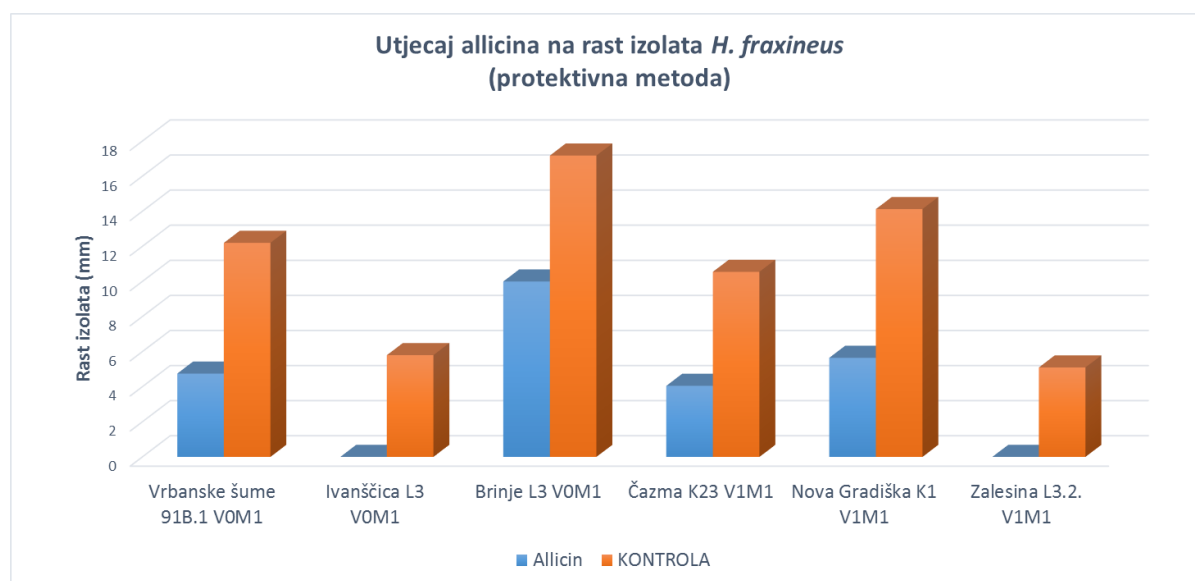
Ivanščica L3 V0M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.001$ )

### **Protektivne metode suzbijanja patogena dodavanjem Allicin sredstva zaštite u agar medium**

Iz rezultata možemo utvrditi da protektivnim metodama primjene Allicin sredstava prije infekcije se može značajno spriječiti rast patogena (Slika 58).

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između rasta tretiranih izolata i kontrolne grupe upotrijebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je utvrdio da kod svih izolata (Vrbanjske šume 91B.1 V0M1, Ivanščica L3 V0M1, Brinje L3 V0M1, Čazma K23 V1M1, Nova Gradiška K1 V1M1, Zalesina L3.2 V1M1) se tretirani izolati statistički značajno razlikuju od kontrolne skupine (Slika 58).





Slika 58. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na rast izolata *H. fraxineus* protektivnim metodama suzbijanja patogena *in vitro* nakon 14 dana

Figure 58. Influence of Allicine plant protection agent on *H. fraxineus* isolate growth according to protective methods of pathogen suppression *in vitro* after 14 days

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između djelotvornosti Allicina po svojstvu rasta izolata upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Kruskal-Wallis ANOVA za nezavisne uzorke koji je utvrdio statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između izolata  $\chi^2(5) = 46.265$ ,  $p = 0.000$ .

Da bi se utvrdilo izolati se međusobno statistički značajno razlikuju u rastu ( $p < 0.05$ ) nakon tretiranja Allicinom upotrijebljen je Post hoc Dunn-Bonferroni test koji je utvrdio razlike između izolata:

Ivanščica L3 V0M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.003$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.003$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Čazma K23 V1M1 ( $p = 0.031$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.005$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Brinje L3 V0M1 ( $p = 0.000$ )

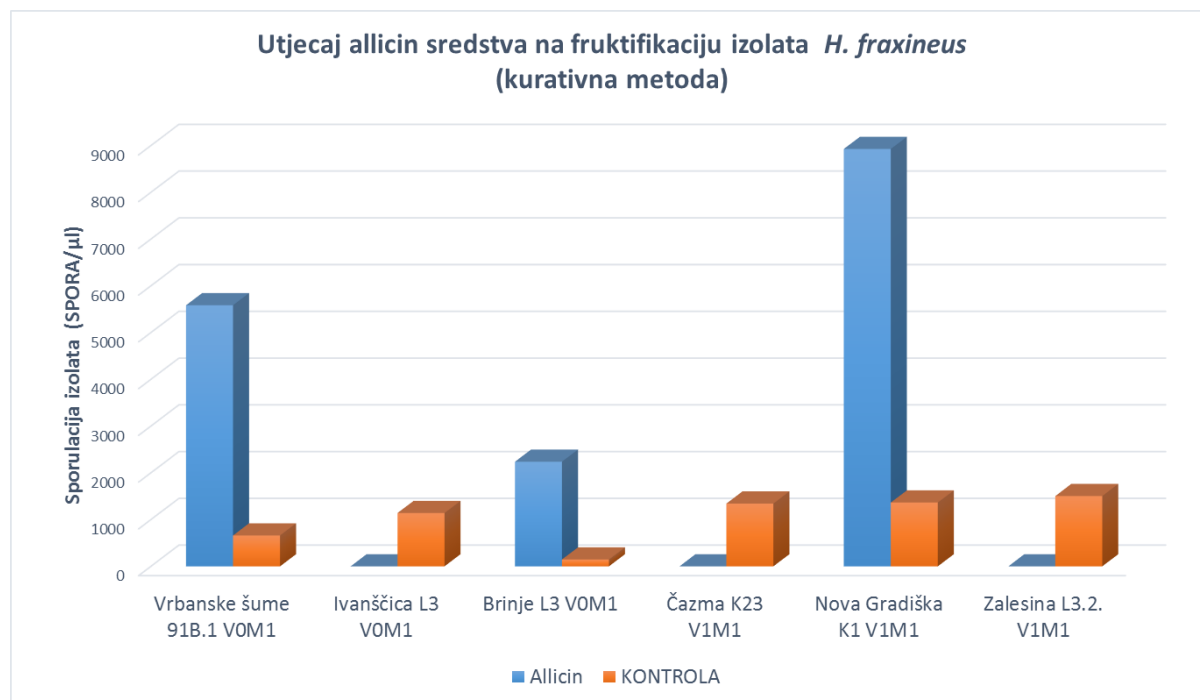
Zalesina L3.2 V1M1 - Čazma K23 V1M1 ( $p = 0.031$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.005$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Brinje L3 V0M1 ( $p = 0.000$ )

### Fruktifikacija izolata pri upotrebi kurativne metode suzbijanja patogena

Iz rezultata možemo utvrditi da kurativnom metodom primjene Allicin sredstva nakon infekcije Allicin iskazuje 50% učinkovitost u suzbijanju fruktifikacije patogena (Slika 59).



Slika 59. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na fruktifikaciju izolata *H. fraxineus* kurativnim metodama suzbijanja patogena *in vitro*

Figure 59. Influence of Allicine plant protection agent on *H. fraxineus* isolate fructification according to curative methods of pathogen suppression *in vitro*

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između fruktifikacije tretiranih izolata i kontrolne grupe upotrijebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je utvrdio da kod svih izolata (Vrbanske šume 91B.1 V0M1, Ivanščica L3 V0M1, Brinje L3 V0M1, Čazma K23 V1M1, Nova Gradiška K1 V1M1, Zalesina L3.2 V1M1) se tretirani izolati statistički značajno razlikuju od kontrolne skupine iako kod nekih značajno reduciraju a kod drugih značajno stimuliraju fruktifikaciju (Slika 59).

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između djelotvornosti Allicina po svojstvu fruktifikacije izolata upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Kruskal-Wallis ANOVA za nezavisne uzorke koji je utvrdio statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između izolata  $\chi^2(5) = 56.965$ ,  $p = 0.000$ .

Da bi se utvrdilo izolati se međusobno statistički značajno razlikuju u fruktifikaciji ( $p < 0.05$ ) nakon tretiranja Allicinom upotrijebljen je Post hoc Dunn-Bonferroni test koji je utvrdio razlike između izolata:

Ivanščica L3 V0M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p=0.001$ )

Čazma K23 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p=0.001$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p=0.001$ )

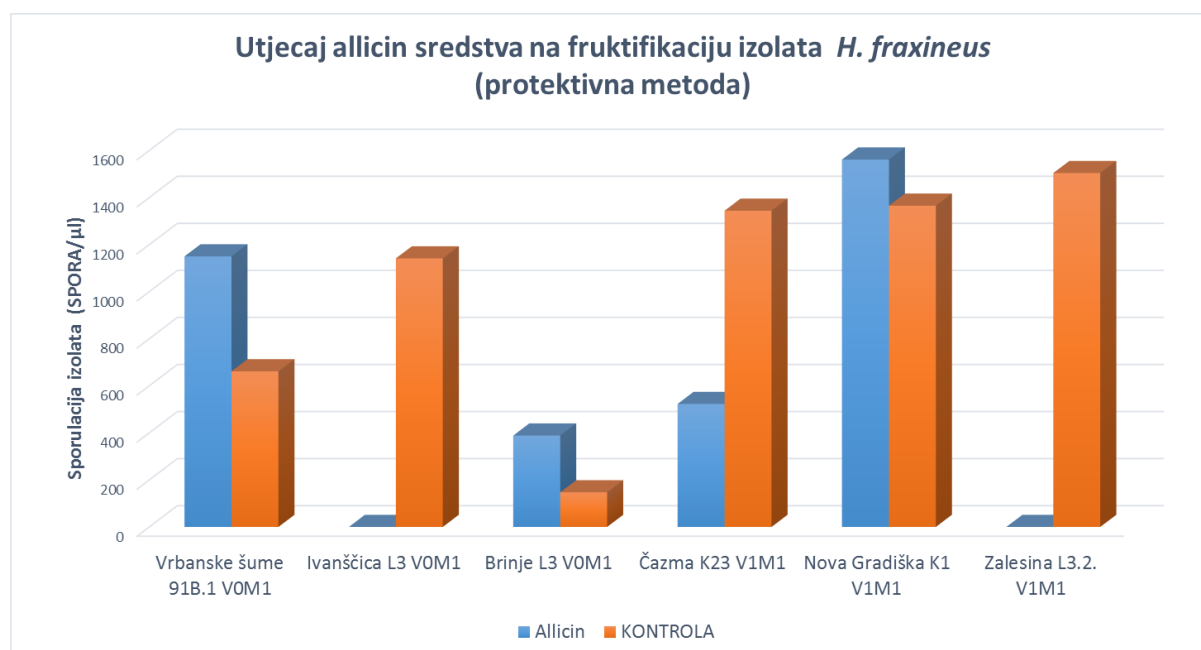
Ivanščica L3 V0M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p=0.000$ )

Čazma K23 V1M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p=0.000$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p=0.000$ )

### Fruktifikacija izolata pri protektivnim metodama suzbijanja patogena

Iz rezultata možemo utvrditi da protektivnim metodama primjene Allicin sredstva nakon infekcije Allicin iskazuje 50% učinkovitost u suzbijanju fruktifikacije patogena (Slika 60), kao i kod kurativne metode primjene.



Slika 60. Utjecaj Allicin sredstva zaštite bilja na fruktifikaciju izolata *H. fraxineus* protektivnim metodama suzbijanja patogena *in vitro*

Figure 60. Influence of Allicin plant protection agent on *H. fraxineus* isolate fructification according to curative methods of pathogen suppression *in vitro*

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između fruktifikacije tretiranih izolata i kontrolne grupe upotrijebljen je Wilcoxon Signed Ranks test koji je utvrdio da kod svih izolata (Vrbanjske šume 91B.1 V0M1, Ivanščica L3 V0M1, Brinje L3 V0M1, Čazma K23 V1M1, Nova Gradiška K1 V1M1, Zalesina L3.2 V1M1) se tretirani izolati statistički značajno razlikuju od kontrolne skupine iako kod nekih značajno reduciraju, a kod drugih značajno stimuliraju fruktifikaciju (Slika 60).

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između djelotvornosti Allicina po svojstvu fruktifikacije izolata upotrijebljen je neparametrijski test analize varijance Kruskal-Wallis ANOVA za nezavisne uzorke koji je utvrdio statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između izolata  $\chi^2(5) = 48.784$ ,  $p = 0.000$ .

Da bi se utvrdilo izolati se međusobno statistički značajno razlikuju u fruktifikaciji ( $p < 0.05$ ) nakon tretiranja Allicinom upotrijebljen je Post hoc Dunn-Bonferroni test koji je utvrdio razlike između izolata:

Ivanščica L3 V0M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.000$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Vrbanjske šume 91B.1 V0M1 ( $p = 0.000$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Čazma K23 V1M1 ( $p = 0.013$ )

Ivanščica L3 V0M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.000$ )

Zalesina L3.2 V1M1 - Čazma K23 V1M1 ( $p = 0.013$ )

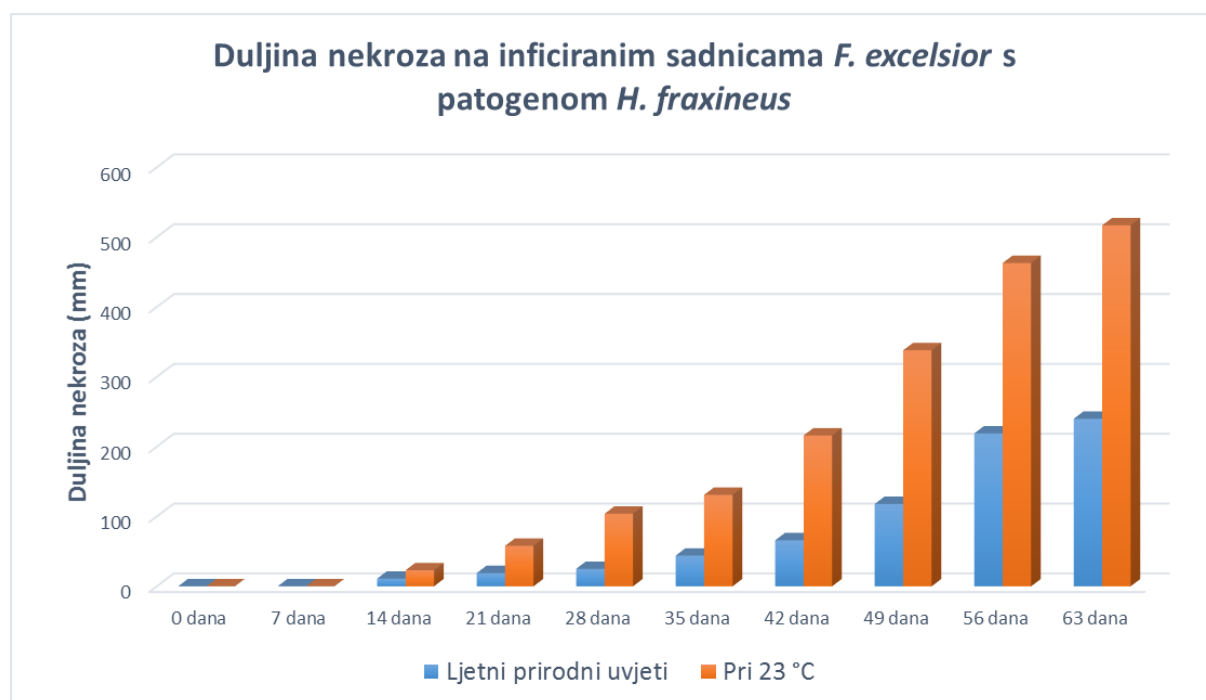
Zalesina L3.2 V1M1 - Nova Gradiška K1 V1M1 ( $p = 0.000$ )

### 3.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena *Hymenoscyphus fraxineus*

#### 3.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena

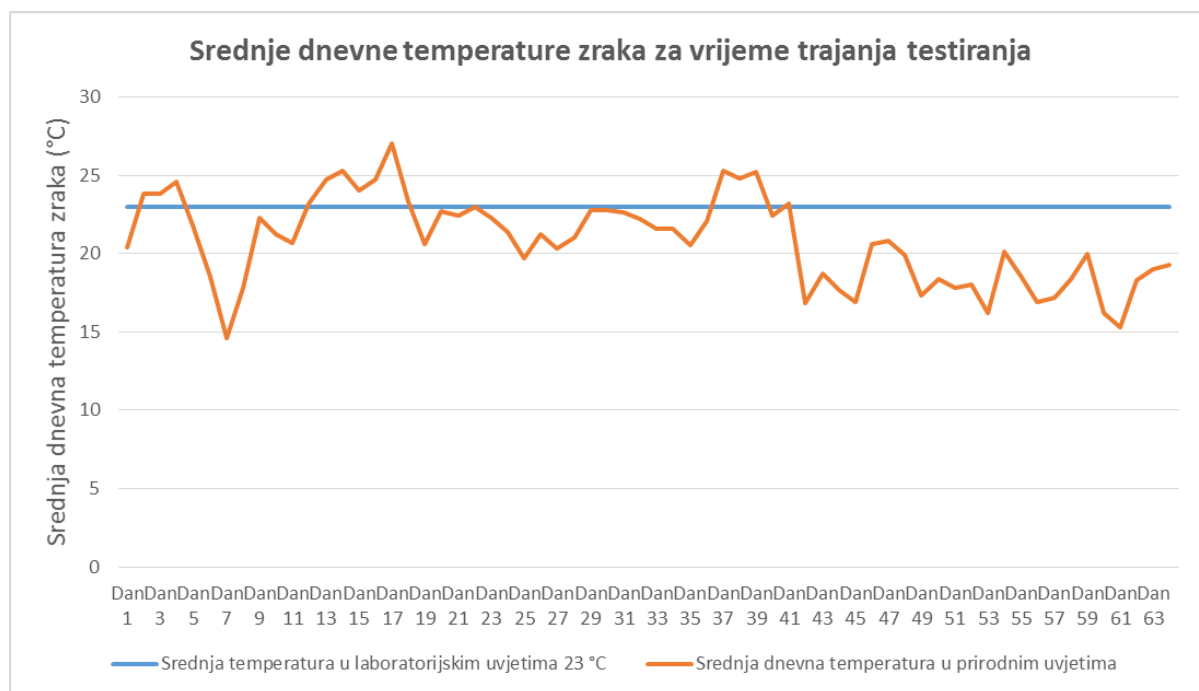
##### 3.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza

Da bi utvrdili postoji li razlika u rastu i razvoju hrvatskih izolata patogene gljive *H. fraxineus* s obzirom na temperaturu kao limitirajući faktor rasta, kreirali smo pokus u kojem smo isti izolat gljive testirali na istoj vrsti domaćina (*F. excelsior*) u dva različita uvjeta s obzirom na temperaturu zraka. Jedan dio testiranja odvijao se u laboratorijskim uvjetima konstantne temperature (23 °C), a drugi dio u prirodnim uvjetima na terenu s promijenjivom temperaturom ljetnog perioda praćenja.



Slika 61. Duljina nekroza na umjetno inficiranim sadnicama *F. excelsior* gljivom *H. fraxineus* u optimalnim laboratorijskim i prirodnim uvjetima ljetnih mjesečnih razdoblja (04.7.2014. – 05.9.2014.)

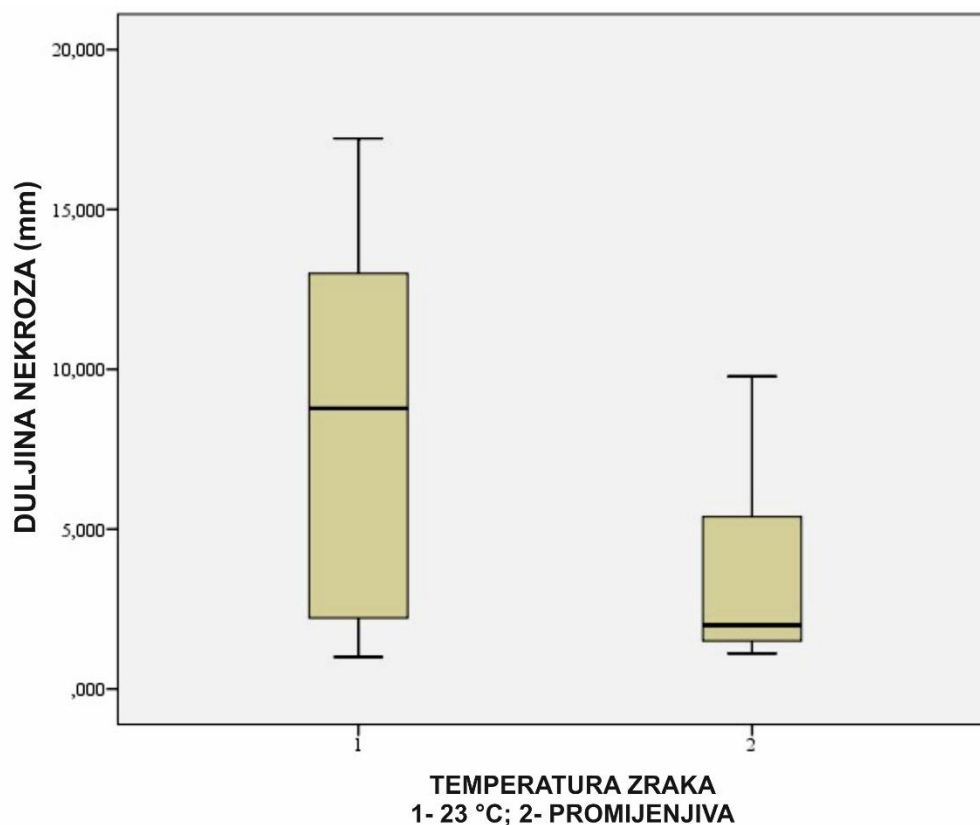
Figure 61. Necrosis length on artificially infected seedlings of *F. excelsior* with *H. fraxineus* in optimal laboratory and natural conditions of summer time period (04.7.2014 – 05.9.2014)



Slika 62. Srednje dnevne temperature zraka u laboratorijskim uvjetima (23 °C) i u prirodnim uvjetima (promijenljive temperature mjerne postaje Zagreb – Maksimir za razdoblje 04.7.2014 – 05.9.2014. godine)

Figure 62. Average daily air temperatures in laboratory conditions (23 °C) and in natural conditions (variable temperatures measured by weather station Zagreb – Maksimir for the period 04.7.2014 – 05.9.2014)

Rezultati su ukazali da konstantna temperatura od 23 °C povoljnije djeluje na rast nekroza od promijenljivih prirodnih uvjeta koji su u periodu mjerenja temperaturom znatno varirali iznad i ispod optimalnih uvjeta (Slika 62). Da bi odredili postoji li statistički značajna razlika između rasta nekroza i temperaturnih uvjeta upotrijebili smo Wilcoxon signed rank test za zavisne uzorke koji je ukazao da ne postoji statistički značajna razlika u rastu nekroza prema temperaturi ( $p=0.128$ ). Međutim, grafovi distribucije rasta nekroza (Slika 63), kao i graf prosječnog rasta nekroza kroz period praćenja (Slika 61) ukazuju jasno da postoji značajna razlika u duljini nekroza, te da temperatura značajno utječe na formiranje nekrotičnih lezija. Duljine nekroza u optimalnim uvjetima na kraju 63 dana praćenja postižu 2.15x veće duljine od nekroza koje su se razvijale ispod ili iznad optimalnih uvjeta (Slika 61; Slika 63). Isto tako taj se trend može iščitati iz cijelog razdoblja praćenja (Slika 61). Statističku analizu treba uzeti s rezervom budući da zbog malog broja uzoraka nije u ovom slučaju pouzdana.



Slika 63. Distribucija duljine nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama *F. excelsior* u uvjetima konstantne temperature (23 °C), te promijenjive temperature prirodnih uvjeta ljetnog perioda

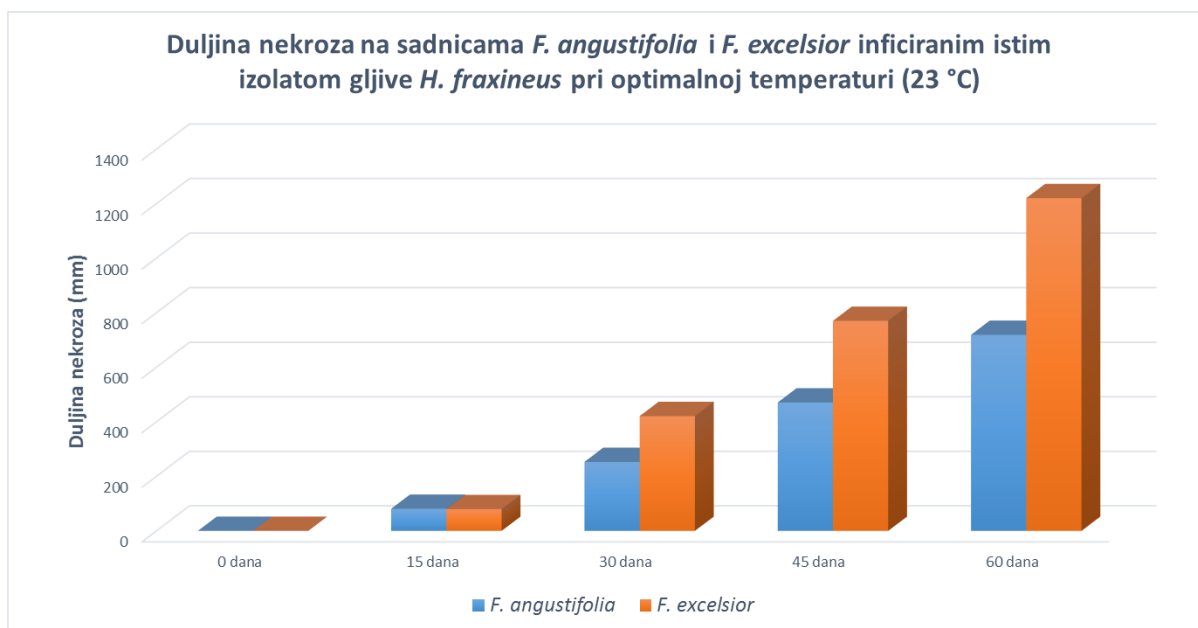
Figure 63. Distribution of necrosis length on artificially inoculated *F. excelsior* seedlings in the conditions of constant temperature (23 °C) and changing temperature conditions of natural summer period

### 3.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza

Da bi se utvrdio utjecaj domaćina na stvaranje i rast nekrotičnih lezija, te utvrdilo generalnu osjetljivost jasena s obzirom na vrstu domaćina prema gljivičnom patogenu *H. fraxineus* testirane su sadnice različitih vrsta jasena umjetno inficirane patogenom po principu umjetnih inokulacijskih metoda.

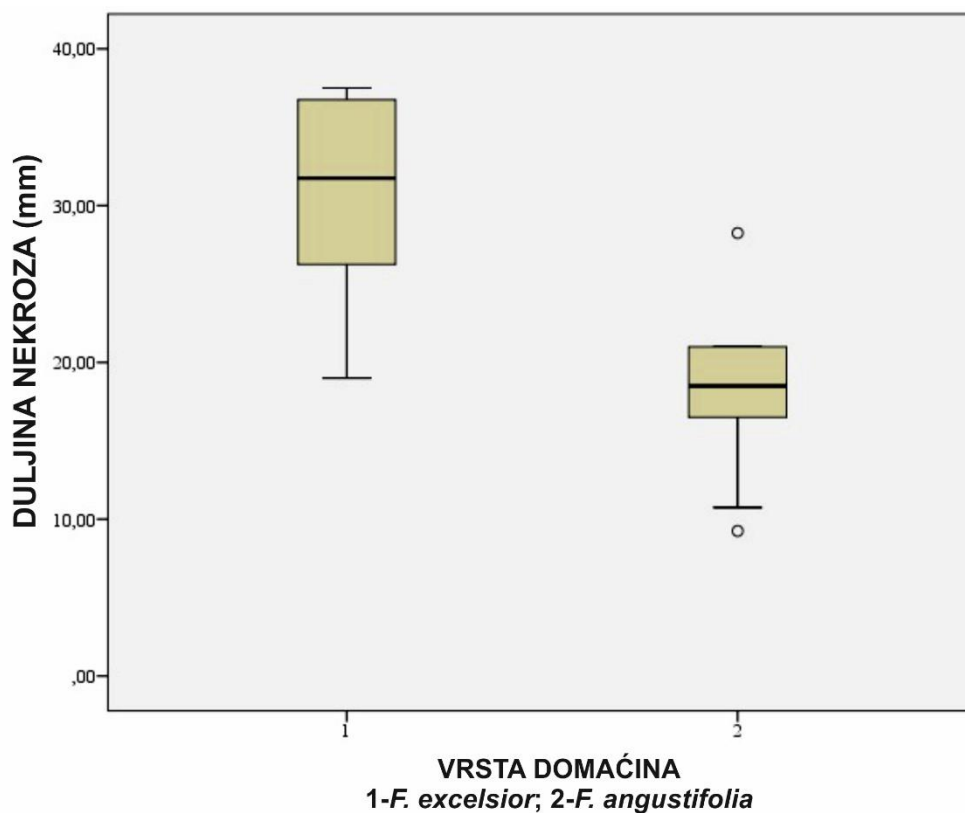
Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između vrsta domaćina s obzirom na rast nekroza, najprije smo testirali normalnost distribucije ( $P > 0.05$ ) koji je pokazao da imamo normalnu distribuciju za obje vrste testiranih jasena. Levenov test za homogenost varijanci pokazao je da su varijance homogene ( $p > 0.05$ ), a t-test za nezavisne uzorke je utvrdio da postoje statistički značajne razlike  $t(18) = 4.850$ ,  $p = 0.000$  u rastu nekroza između vrsta domaćina (*F. excelsior* i *F. angustifolia*).





Slika 64. Duljina nekroza na sadnicama *F. angustifolia* i *F. excelsior* umjetno zaraženim istim izolatom gljive *H. fraxineus* u laboratorijskim uvjetima pri temperaturi od 23 °C

Figure 64. Necrosis length on seedlings of *F. angustifolia* and *F. excelsior* artificially infected with *H. fraxineus* fungus isolate in laboratory conditions with 23 °C temperature



Slika 65. Distribucija duljine nekroza s obzirom na vrstu biljke domaćina inokuliranim patogenom *H. fraxineus*

Figure 65. Distribution of necrosis length in accordance with host plant inoculated with the pathogen *H. fraxineus*

Tablica 31. Rezultati statističke analize za duljinu nekroza s obzirom na vrstu domaćina inficiranog patogenom *H. fraxineus*

Table 31. Results of statistical analysis for necrosis length in accordance with host plant infected with the pathogen *H. fraxineus*

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Vrsta	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RAST	1 FE	0,155	10	0,200*	0,920	10	0,354
	2 FA	0,191	10	0,200*	0,936	10	0,513

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

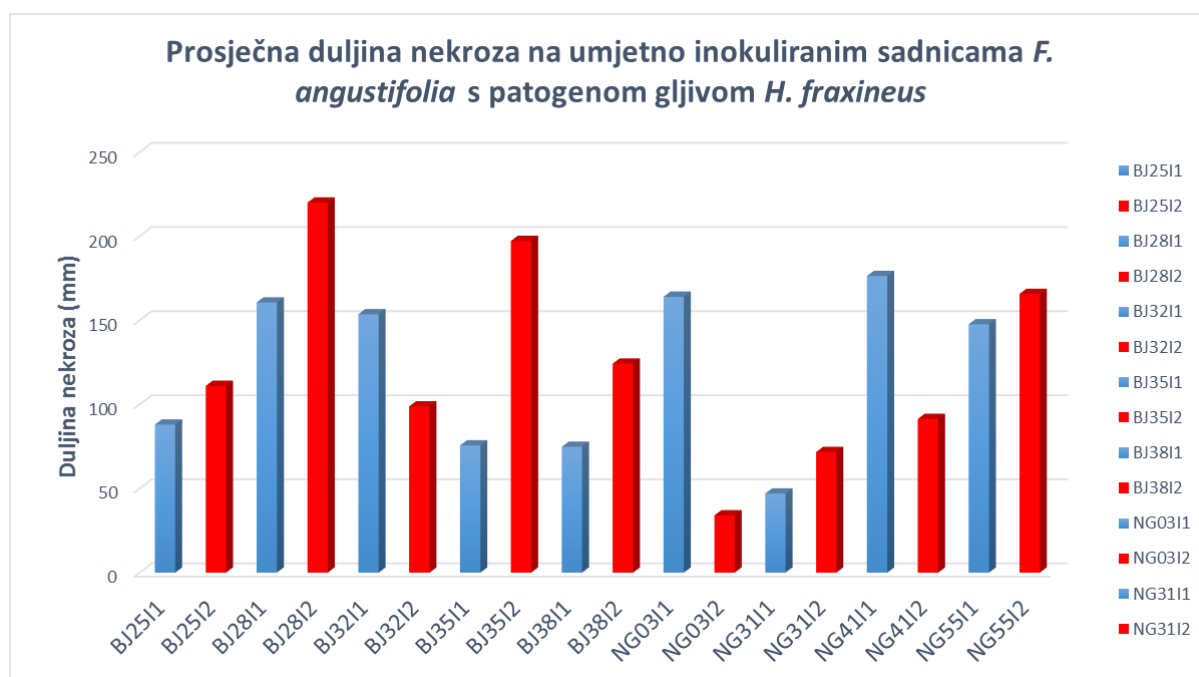
TEST NEZAVISNIH UZORAKA										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
RAST	Equal variances assumed	0,840	0,371	4,850	18	0,000	12,52500	2,58265	7,09906	17,95094
	Equal variances not assumed			4,850	17,653	0,000	12,52500	2,58265	7,09140	17,95860

### 3.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena

Da bi utvrdili pojavu osjetljivosti odnosno rezistentnosti poljskog jasena na djelovanje patogena *H. fraxineus*, testirali smo klonove odnosno poznate genotipove plus stabala poljskog jasena iz dvije glavne Hrvatske sjemenske provenijencije koje pripadaju dvjema sjemenskim regijama. Testiranje se izvodilo na ukupno devet klonova i dva gljivična izolata opisanih u poglavlju materijali i metode.

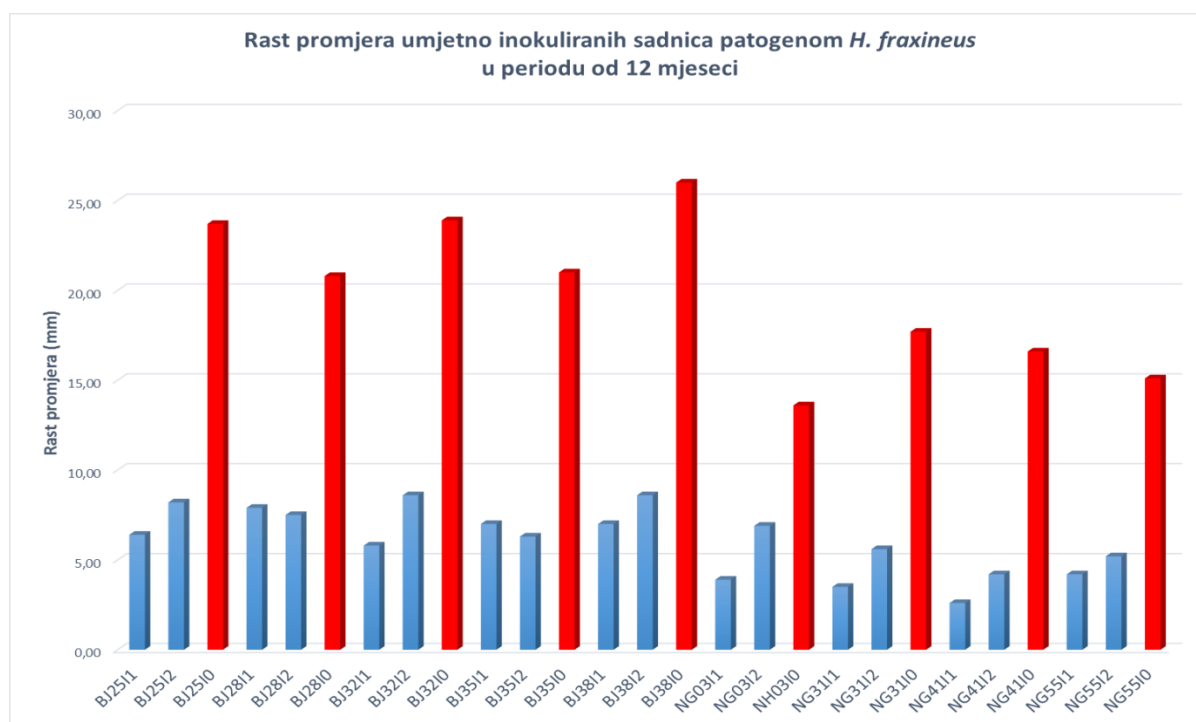
Za statističku analizu upotrijebili smo neparametrijski Kruskal-Wallis test za nezavisne uzorke da utvrdimo postoji li statistička razlika u ukupnom rastu nekroza između klonova neovisno o podrijetlu i izolatu gljive, koji je utvrdio da nema statistički značajne razlike između klonova  $\chi^2(8) = 14.927$ ,  $p = 0.061$  za rast nekroza (Slika 72). Korelacija rasta nekroza između klonova je jaka ( $p < 0.01$ ), što utvrđuje da se rast nekroza po razdobljima mjerenja jednako kreće za većinu klonova (Tablica 32). Isto se može iščitati i iz grafa koji prikazuje

ukupan rast nekroza s obzirom na klonove i izolate (Slika 66). Također se iz istog grafa može iščitati kako su sve kontrolne sadnice ostale neinficirane do kraja testiranja. U rastu promjera nakon godine dana infekcijskog perioda rezultati ukazuju na značajan pad promjera inficiranih sadnica poljskog jasena s obzirom na kontrolne neinficirane sadnice (Slika 67). Godinu dana nakon inokulacije patogenom sve inficirane sadnice ukazale su simptome bolesti, te je stopa mortaliteta odumrlih sadnica 49%, sadnica s odumrlim vrhom 5% i preostalih 46% sadnica s značajnim simptomima bolesti i degradacijom vitaliteta (Slika 69).



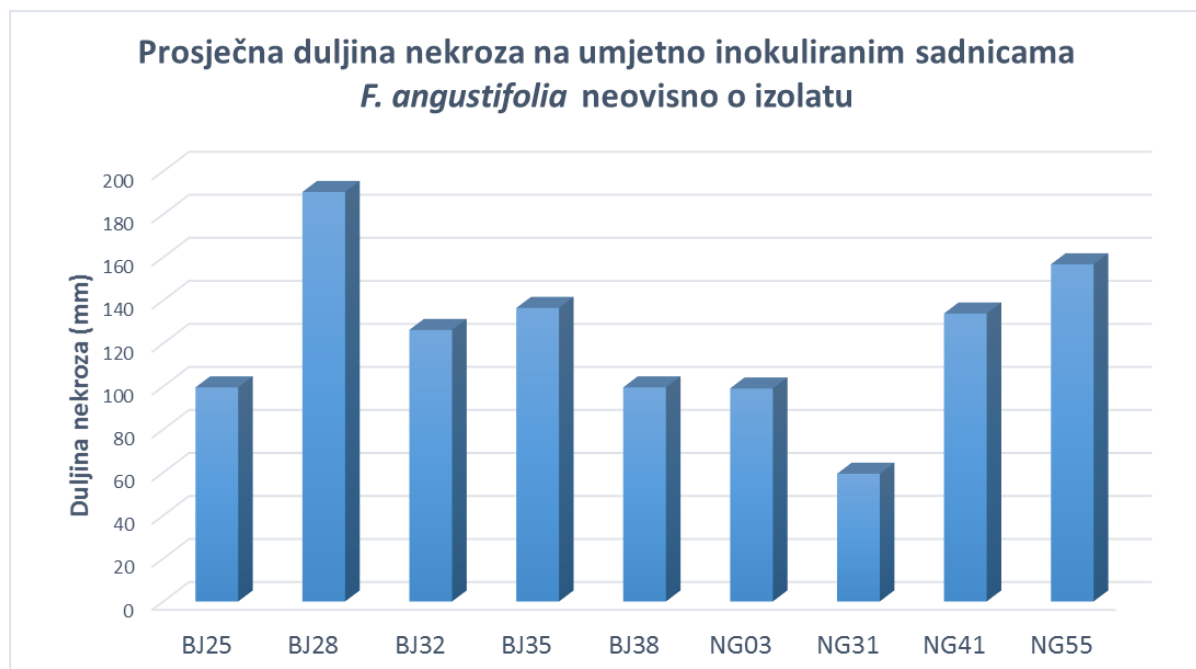
Slika 66. Duljina nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama klonova poljskog jasena (*F. angustifolia*) s dva izolata patogene gljive *H. fraxineus*, u vremenskom periodu od 140 dana

Figure 66. Necrosis length on artificially inoculated clone seedlings of *F. angustifolia* with two isolates of pathogenic fungus *H. fraxineus* in the time period of 140 days



Slika 67. Rast promjera na umjetno inokuliranim sadnicama klonova poljskog jasena (*F. angustifolia*) s dva izolata patogene gljive *H. fraxineus*, te kontrolne sadnice inokulirane sterilnim mediumom

Figure 67. Diameter growth of artificially inoculated clone seedlings of *F. angustifolia* with two isolates of pathogenic fungus *H. fraxineus* and control seedlings inoculated with sterile agar medium

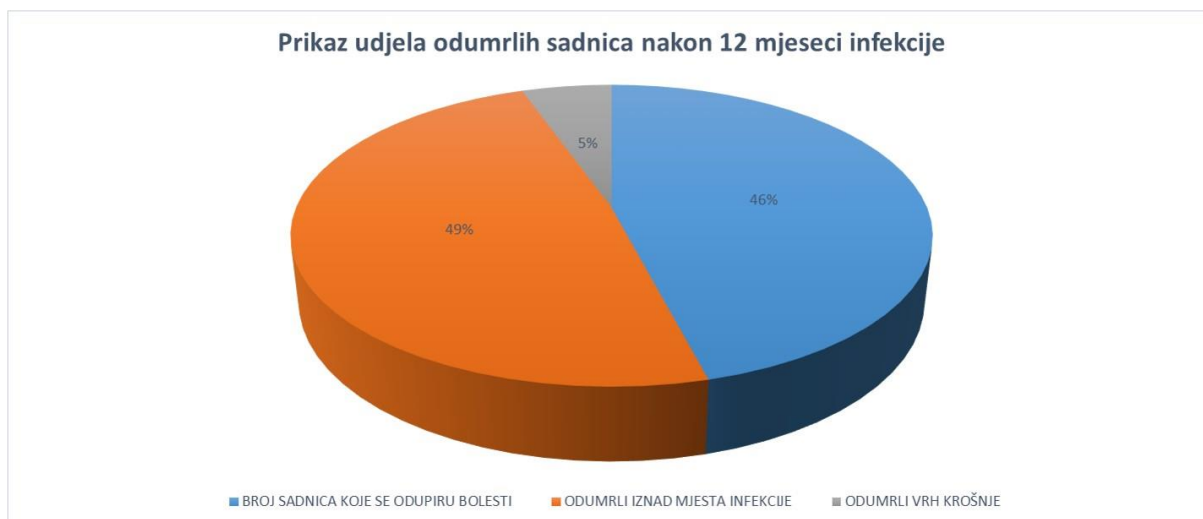


Slika 68. Prosječna duljina nekroza na inokuliranim sadnicama *F. angustifolia* neovisno o upotrebljenom izolatu patogena *H. fraxineus*

Figure 68. Average necrosis length on inoculated *F. angustifolia* seedlings regardless of the *H. fraxineus* isolate used

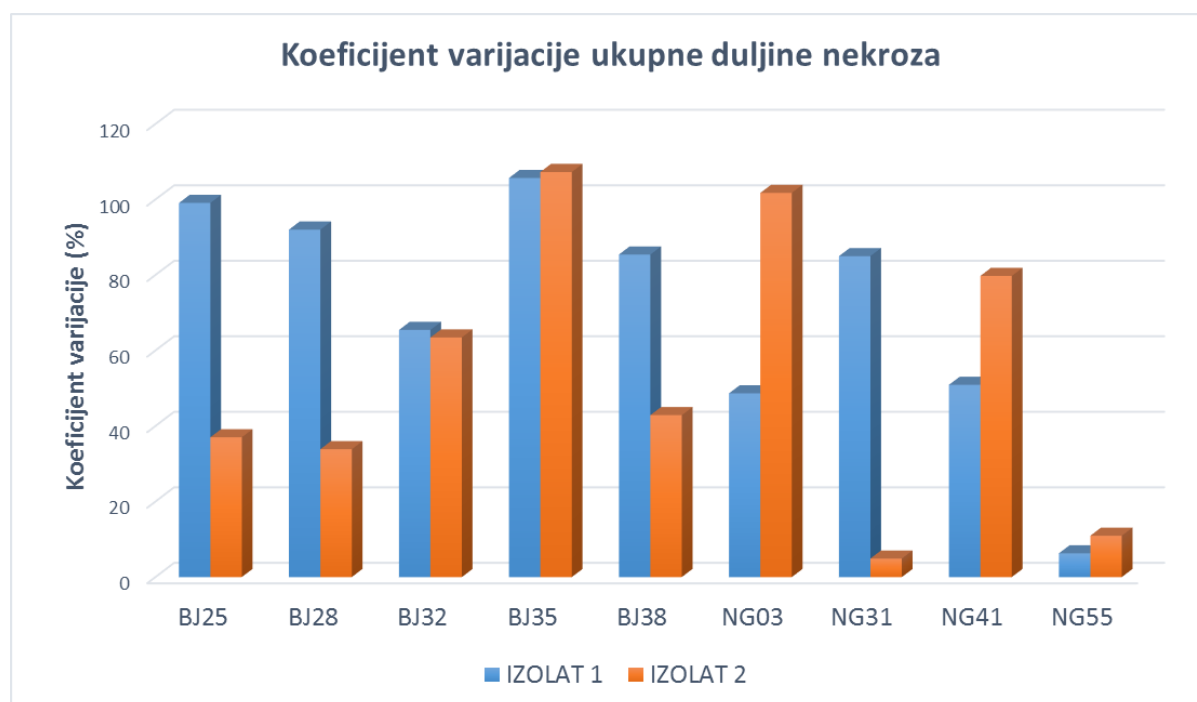
Kod testiranja osjetljivosti klonova poljskog jasena na djelovanje patogena *H. Fraxineus*, stopa infekcije dosegla je 97% u samo prva 4 mjeseca od početka pokusa inokulacije. Samo 3% inokuliranih klonova nije produciralo nekrotične lezije. Nedostatak vizualnih simptoma infekcije je primijećen na dvije ramete koje pripadaju klonovima BJ38 i BJ25 inokuliranim izolatom 1.

Koeficijent varijacije (CV) je izračunat da bi se mogla analizirati intraklonska varijabilnost finalnih duljina nekroza na stabljikama klonova za svaki upotrijebljeni gljivični izolat. Rezultati otkrivaju vrlo visoki stupanj intraklonskog varijabiliteta, osim unutar klona NG55 gdje je intraklonska varijabilnost bila najmanja za oba izolata. Za izolat 1, stopa intraklonske varijabilnosti u klonovima iz plantaže Čazma bila je jako visoka (iznad 60%), a najniže stope varijabiliteta su utvrđene kod dva od četiri klona iz plantaže Nova Gradiška (klon NG03 i NG55), te kod dva od pet klonova iz plantaže Čazma (klon BJ32 i BJ38). Kod izolata 2, najniža stopa intraklonske varijabilnosti je utvrđena u tri od pet klonova iz plantaže Čazma (klon BJ25, BJ28 i BJ38), te također u dva od četiri klona iz plantaže Nova Gradiška (klon NG31 i NG55).



Slika 69. Stopa mortaliteta inficiranih sadnica odnosno udio inficiranih sadnica prema stupnju oštećenosti

Figure 69. Mortality rate of infected seedlings or share of infected seedlings according to the degree of damage



Slika 70. Koeficijent varijacije (CV) duljine nekroza unutar klona (%)

Figure 70. Coefficient of variation (CV) of necrosis length within clones (%)

Da bi se utvrdila postoji li statistički značajna razlika u rastu nekroza između klonova s obzirom na gljivične izolate, najprije je upotrijebljen Shapiro-Wilkov test za normalnost distribucije kojim je utvrđeno da nije prisutna normalna distribucija duljine nekroza u svim klonovima, pa se za daljnju statističku analizu upotrebljavao neparametrijski Wilcoxon Rank test za zavisne uzorke na svakom klonu. Također za svaki klon testirana je korelacija rasta nekroza između izolata. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u rastu nekroza između izolata na klonovima:

BJ25 ( $p=0.007$ , korelacija  $p<0.01$ ), BJ35 ( $p=0.009$ , korelacija  $p<0.01$ ), BJ38 ( $p=0.028$ , korelacija  $p<0.01$ )

NG41 ( $p=0.038$ , korelacija  $p<0.01$ )

Nije utvrđena statistički značajna razlika između izolata na klonovima:

BJ28 ( $p=0.221$ , korelacija  $p<0.05$ ), BJ32 ( $p=0.285$ , nema korelacije)

NG03 ( $p=0.086$ , nema korelacije), NG31 ( $p=0.474$ , korelacija  $p<0.01$ ), NG55 ( $p=0.414$ , korelacija  $p<0.05$ )

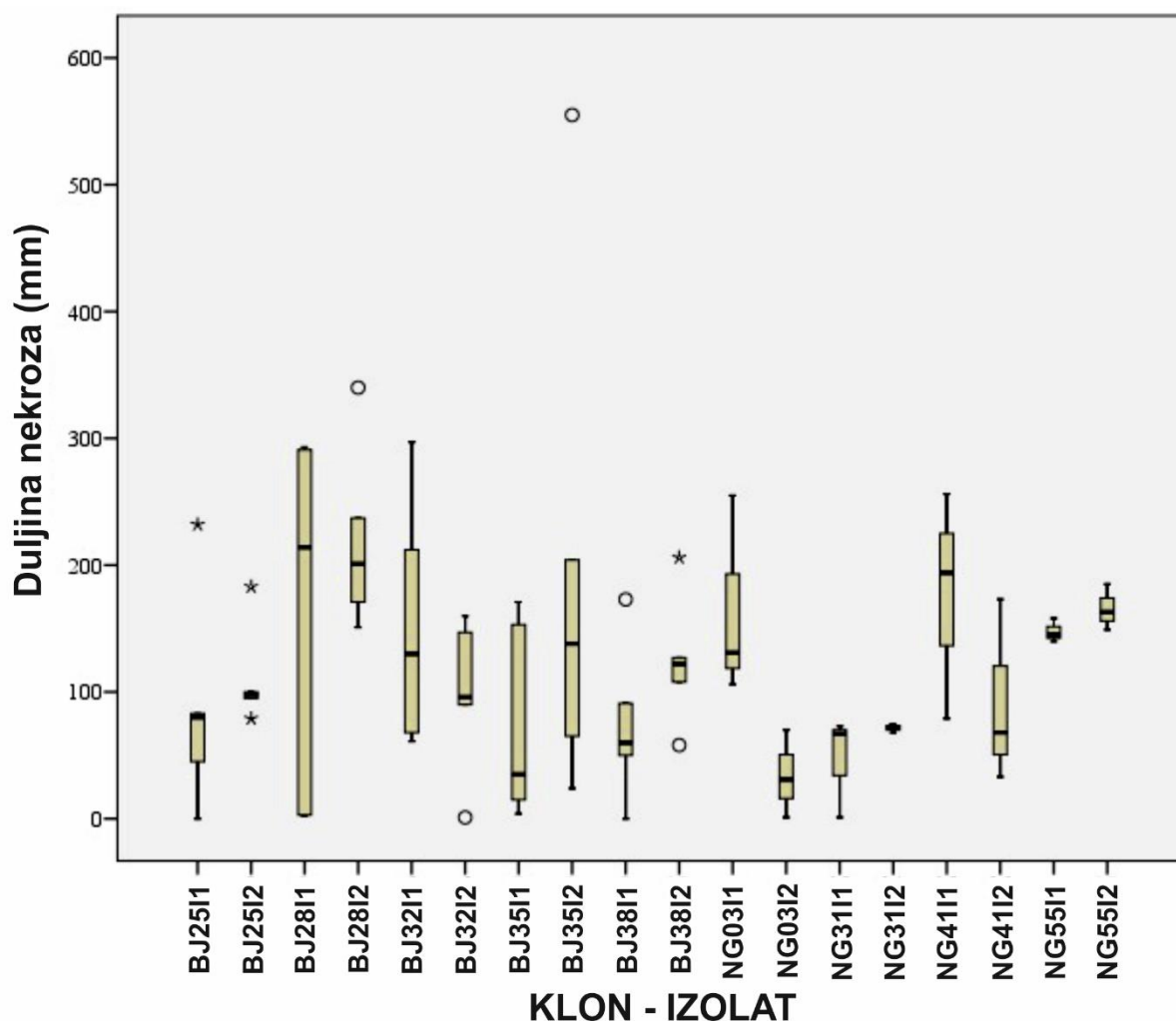
Na pet od devet klonova korelacija rasta nekroza i izolata je značajna na nivou  $p<0.01$ , a na dva klona je korelacija značajna na nivou  $p<0.05$ . Na četiri klona pokazala se statistički

značajna razlika u rastu nekroza između izolata gljive (BJ25, BJ35, BJ38, NG41) dok na pet klonova nije bilo statistički značajne razlike unutar klona u rastu nekroza s obzirom na izolat gljive (BJ28, BJ32, NG03, NG31, NG55).

S obzirom na inokulaciju izolatom 1, najdulje nekroze razvile su se na klonovima BJ28 i BJ32 iz plantaže Čazma, te NG03 i NG41 iz plantaže Nova Gradiška. Klon s najvećom varijacijom između minimalne i maksimalne vrijednosti duljine nekroze bio je klon BJ28. Najkraće nekroze razvile su se na klonu BJ38 i BJ35 iz plantaže Čazma, te NG31 i NG55 iz plantaže Nova Gradiška.

S obzirom na inokulaciju izolatom 2, generalno varijacije minimalnih i maksimalnih vrijednosti duljina nekroza poklapala su se s vrijednostima u izolatu 1. Najdulje nekroze razvile su se na klonovima BJ28 i BJ35 iz plantaže Čazma, te na klonovima NG41 i NG55 iz plantaže Nova Gradiška. Klon s najvećim rangom varijacije između minimalne i maksimalne vrijednosti duljine nekroze bio je klon BJ35. Najkraće nekroze razvile su se na klonovima BJ32 i BJ25 iz plantaže Čazma, te NG03 i NG31 iz plantaže Nova Gradiška, što djelomično korelira s vrijednostima izolata 1, otkrivajući klon NG31 kao najmanje osjetljivim klonom ili s najrazvijenijom tolerancijom na gljivičnog patogena *H. fraxineus*.





Slika 71. Distribucija duljine nekroza na klonovima poljskog jasena s dva različita izolata gljivičnog patogena *H. fraxineus*

Figure 71. Distribution of necrosis length on narrow-leaved ash clones with two different *H. fraxineus* pathogenic fungal isolates

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u rastu duljine nekroza između klonova neovisno o gljivičnom izolatu testirala se normalnost distribucije Shapiro-Wilkovim testom kojim je utvrđeno da nije prisutna normalna distribucija rasta nekroza u svim klonovima, pa se za daljnju statističku analizu upotrebljavao neparametrijski Kruskal-Wallis test za nezavisne uzorke koji je utvrdio da nema statistički značajne razlike između klonova  $\chi^2(8) = 14.927$ ,  $p = 0.061$  za rast nekroza (Slika 72). Korelacija rasta nekroza između klonova je jaka ( $p < 0.01$ ), što utvrđuje da se rast nekroza po razdobljima mjerenja jednako kreće za većinu klonova (Tablica 32).

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika između klonova s obzirom na podrijetlo klonova (Bjelovar – Nova Gradiška) upotrijebljen je Shapiro-Wilkov test koji je pokazao da

samo Nova Gradiška ima normalnost distribucije, stoga je upotrebljavan neparametrijski Mann-Whitney U test koji je utvrdio da nema statistički značajne razlike ( $p=0.690$ ) u rastu nekroza između klonova s obzirom na podrijetlo klonova.

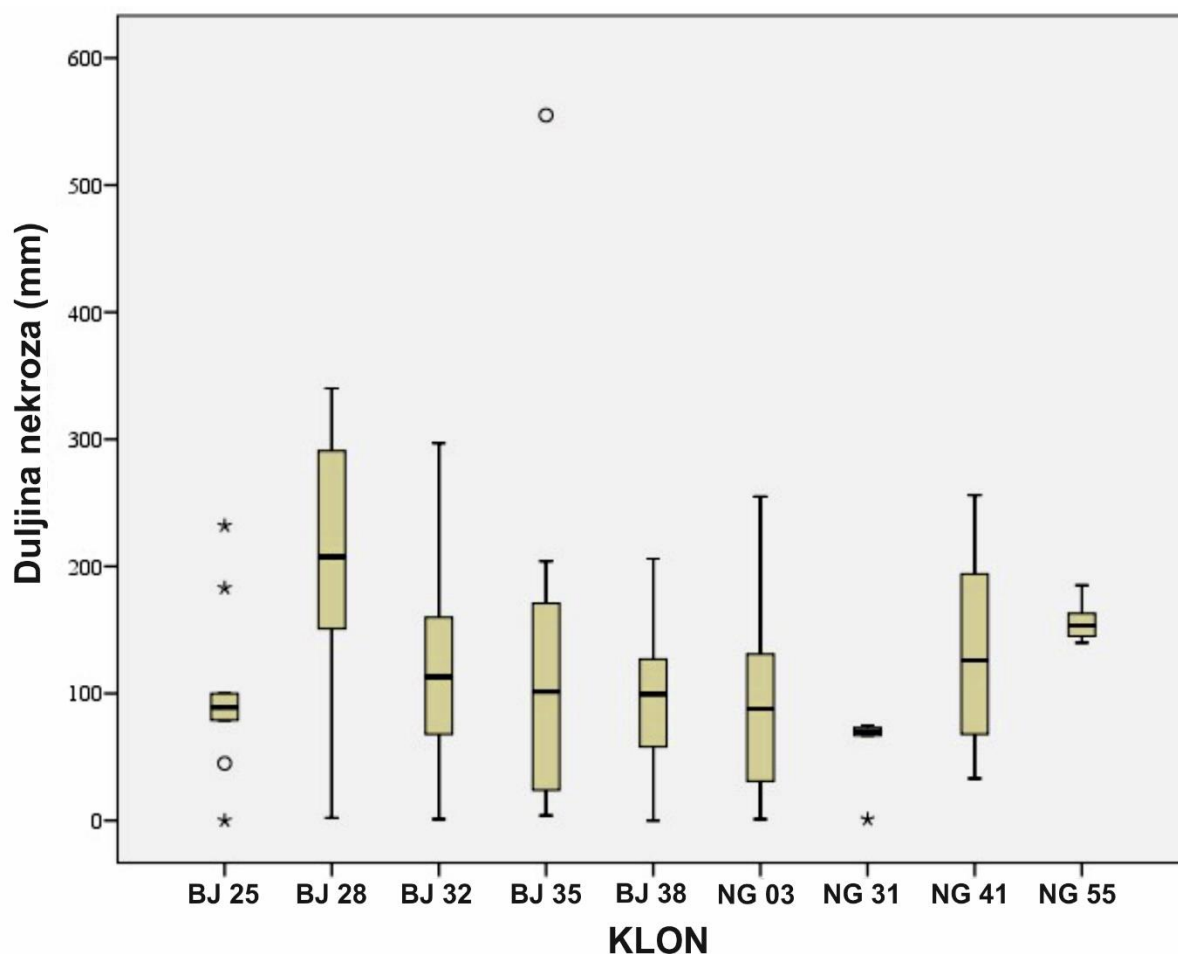
Tablica 32. Korelacija vrijednosti rasta duljine nekroza po razdobljima mjerenja na svakom klonu

Table 32. Correlation of necrosis length growth values according the measuring period on every clone

KORELACIJA RASTA DULJINE NEKROZA IZMEĐU KLONOVA										
		BJ_25	BJ_28	BJ_32	BJ_35	BJ_38	NG_3	NG_31	NG_41	NG_55
BJ_25	Pearson Correlation	1	0,272	0,192	0,850**	0,505	0,307	0,998**	0,261	0,449
	Sig. (2-tailed)		0,447	0,595	0,002	0,137	0,388	0,000	0,467	0,193
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
BJ_28	Pearson Correlation	0,272	1	0,877**	0,674*	0,752*	0,718*	0,315	0,715*	0,881**
	Sig. (2-tailed)	0,447		0,001	0,032	0,012	0,019	0,375	0,020	0,001
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
BJ_32	Pearson Correlation	0,192	0,877**	1	0,621	0,783**	0,729*	0,232	0,898**	0,763*
	Sig. (2-tailed)	0,595	0,001		0,055	0,007	0,017	0,520	0,000	0,010
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
BJ_35	Pearson Correlation	0,850**	0,674*	0,621	1	0,857**	0,477	0,869**	0,587	0,716*
	Sig. (2-tailed)	0,002	0,032	0,055		0,002	0,163	0,001	0,075	0,020
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
BJ_38	Pearson Correlation	0,505	0,752*	0,783**	0,857**	1	0,348	0,538	0,657*	0,593
	Sig. (2-tailed)	0,137	0,012	0,007	0,002		0,324	0,109	0,039	0,071
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NG_3	Pearson Correlation	0,307	0,718*	0,729*	0,477	0,348	1	0,322	0,783**	0,873**
	Sig. (2-tailed)	0,388	0,019	0,017	0,163	0,324		0,364	0,007	0,001
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NG_31	Pearson Correlation	0,998**	0,315	0,232	0,869**	0,538	0,322	1	0,275	0,471
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,375	0,520	0,001	0,109	0,364		0,441	0,169
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NG_41	Pearson Correlation	0,261	0,715*	0,898**	0,587	0,657*	0,783**	0,275	1	0,744*
	Sig. (2-tailed)	0,467	0,020	0,000	0,075	0,039	0,007	0,441		0,014
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NG_55	Pearson Correlation	0,449	0,881**	0,763*	0,716*	0,593	0,873**	0,471	0,744*	1
	Sig. (2-tailed)	0,193	0,001	0,010	0,020	0,071	0,001	0,169	0,014	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



Slika 72. Distribucija duljine nekroza na klonovima poljskog jasena neovisno o gljivičnim izolatima

Figure 72. Distribution of necrosis length on narrow-leaved ash clones regardless of the fungal isolates used

### 3.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena

#### Stanje ishrane zaraženih i nezaraženih klonova poljskog jasena

Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike između načina sakupljanja uzoraka, te se vrijednosti koncentracije biogenih elemenata ne razlikuju značajno ovisno načinu sakupljanja uzoraka lišća (u prilogu Slika 89; Slika 90; Slika 91).

Da bi se utvrdila postoji li statistički značajna razlika između nezaraženih (kontrolnih) i zaraženih klonova prema koncentraciji biogenih elemenata u lišću klonova s obzirom na gljivične izolate, upotrebljavali smo neparametrijski Wilcoxon Rank test za zavisne uzorke na

svakom klonu. Rezultati su utvrdili da za sljedeće elemente postoji statistički značajna razlika između kontrolnih klonova i klonova inficiranih izolatima gljivičnog patogena:

N (BJ35I0 – BJ35I2; BJ38I0 – BJ38I1)

K (BJ28I0 – BJ28I2; BJ38I0 – BJ38I1; BJ38I0 – BJ38I2)

C (BJ28I0 – BJ28I1; BJ32I0 – BJ32I1)

Ca (BJ28I0 – BJ28I1; BJ32I0 – BJ32I1)

Mg (BJ32I0 – BJ32I1)

Fe (BJ35I0 – BJ35I2)

Zn (BJ25I0 – BJ25I1; BJ32I0 – BJ32I1; BJ32I0 – BJ32I2; BJ38I0 – BJ38I2)

B (BJ32I0 – BJ32I1; BJ35I0 – BJ35I1)

Za mangan nisu utvrđene razlike kontrolnih i zaraženih klonova.

Između koncentracija biogenih elemenata u lišću pojedinih klonova, s obzirom na gljivične izolate, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika. Većina klonova po pojedinom elementu razlikovala se samo s jednim izolatom patogena u odnosu na kontrolu, međutim kod kalija (klon BJ38) i cinka (klon BJ32) se ukazala statistički značajna razlika u klonovima na oba izolata.

Da bi se utvrdilo postoji li jednako kretanje u koncentraciji elemenata u lišću upotrijebili smo Pearson test korelaciju koja je utvrdila da većina biogenih elemenata korelira međusobno (u prilogu Tablica 50; Tablica 51; Tablica 52). Korelacije su vidljive između:

N korelira s Mn, Ca, K i Mg.

K korelira s B, N, C, K i Mg.

C korelira s B, Fe, Ca, K i Mg.

Ca korelira s Mn, N, C, K i Mg.

Mg korelira s Mn, N, C, Ca i K.

Fe korelira s C.

Mn korelira s N, Ca i Mg.

B korelira s C i K.

Cink ne korelira s drugim biogenim elementima.

Da bi se utvrdilo postoji li korelacija koncentracije biogenih elemenata u lišću poljskog jasena i duljine nekroza na pojedinom klonu upotrijebljena je također Pearson test korelacija koja je utvrdila statistički značajne pozitivne korelacije koncentracija dušika, kalija, kalcija, magnezija i mangana te negativnu statistički značajnu korelaciju koncentracija ugljika s duljinom nekroza. (Tablica 50; Tablica 51; Tablica 52).

Koncentracije prosječnih vrijednosti biogenih elemenata inficiranih sadnica, neovisno o izolatu gljive, bile su smanjene u odnosu na neinficirane sadnice (kontrola) za sljedeće elemente (Slika 92; Slika 93; Slika 94; Slika 95):

N (klon NG03, NG31)

K (klon NG03, NG31)

C (klon BJ25, BJ32, BJ35, BJ38, NG41, NG55)

Ca (klon BJ28, BJ38, NG03, NG31)

Mg (klon NG03, NG31, NG41)

Fe (klon BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38, NG03, NG41)

Zn (klon BJ35, NG41)

Mn (klon BJ25, BJ35, BJ38, NG03, NG31, NG41)

B (klon BJ28, NG03, NG31)

Koncentracije prosječnih vrijednosti biogenih elemenata inficiranih sadnica, neovisno o izolatu gljive, bile su povećane u odnosu na neinficirane sadnice (kontrola) za sljedeće elemente (Slika 92; Slika 93; Slika 94; Slika 95):

N (klon BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38, NG41, NG55)

K (klon BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38, NG41, NG55)

C (klon BJ28, NG03, NG31)

Ca (klon BJ25, BJ32, BJ35, NG41, NG55)

Mg (klon BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38, NG55)

Fe (klon NG31, NG55)

Zn (klon BJ25, BJ28, BJ32, BJ38, NG03, NG31, NG55)

Mn (klon BJ28, BJ32, NG55)

## B (klon BJ25, BJ32, BJ35, BJ38, NG41, NG55)

Koncentracije biogenih elemenata u lišću inficiranih i neinficiranih sadnica istog klona ovisno o izolatu ukazuju da genetska varijabilnost jedinke, u ovom slučaju i patogena i domaćina, jasno utječe na stanje ishrane.

Ugljik (C) je jedini element koji je pokazao statističku značajnu negativnu korelaciju s duljinama nekroza zaraženih klonova. Šest od ukupno devet klonova imaju niže koncentracije ugljika u inficiranim u odnosu na neinficirane sadnice (Slika 93).

Koncentracije kalcija, magnezija, željeza, mangana i bora bile su više od granične vrijednosti nedostatka u svim testiranim klonovima (Slika 92; Slika 93; Slika 94; Slika 95). Koncentracije dušika, kalija i cinka bile su niže od granične vrijednosti nedostatka, i to za cink kod svih klonova, za dušik kod svih klonova osim klona NG41 – IZOLAT 1, te NG55 IZOLAT 1 i IZOLAT 2, te za kalij, kod klonova BJ25I1, BJ25I0, BJ28I1, BJ28I0, BJ32I0, BJ35I0, NG03I2, NG31I1, NG31I2, NG31I0, NG41I2, NG41I0 i NG55I0.

Kod testiranja osjetljivosti klonova na djelovanje patogena *H. fraxineus* najtolerantniji klonovi su klonovi BJ25, BJ38, NG03 i NG31 (Slika 68). Usporedbom sa stanjem ishrane isti klonovi imaju smanjene koncentracije sljedećih elemenata u odnosu na kontrolu (Slika 94; Slika 95):

BJ25 (C, Fe, Mn, Al, Cr)

BJ38 (C, Fe, Mn, Ca, Al, Ba, Na, Sr, Ti)

NG03 (B, Fe, Mn, N, Ca, K, Mg, Al, Ba, Cr, Mo, Na, Sr, Ti)

NG31 (B, Mn, N, Ca, K, Mg, Ba, Mo, Sr, Ti)

Povišene su vrijednosti sljedećih elemenata:

BJ25 (B, Zn, N, Ca, K, Mg, Ba, Mo, Na, Sr, Ti)

BJ38 (B, Zn, N, K, Mg, Cr, Mo)

NG03 (C, Zn)

NG31 (C, Fe, Zn, Al, Cr, Na)

### 3.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena

Praćenjem klonskih sjemenskih plantaža poljskog jasena uspostavljeno je opažanje fenologije listanja (u proljeće), te fenologije odbacivanja lista (u jesen). Praćenjem fenologije listanja, njegov razvoj podijeljen je na 6 fenofaza, međutim u istraživanju je analizirana i korištena FAZA 2. Za analizu uzimane su vrijednosti tri godine mjerenja (2014., 2015. i 2016. godine) za proljetnu fenologiju, te 2013., 2014. i 2015. godina za jesensku fenologiju.

Za proljetnu fenologiju proračunavao se broj dana za svaku rametu posebno od 01.siječnja do ulaska u FAZU 2, dok se kod jesenske fenologije uzimalo u obzir sve fenofaze otpadanja lista u jednom mjerenju istog dana procjene. Fenološki podaci su obrađivani za samo devet klonova na kojima su se vršili testovi osjetljivosti na patogena *H. fraxineus*, a podaci za fenološku obradu dobiveni su direktno opažanjem i mjerenjem u klonskim sjemenskim plantažama. Prosječne vrijednosti broja dana s obzirom na početak listanja iznosile su od 93 – 98 dana za ranu fenotipsku grupu i 95 – 104 za kasnu fenotipsku grupu. Kod fenologije listanja prosječna razlika u danima između klastera rane fenotipske grupe i klastera kasne fenotipske grupe iznosila je 7 dana (5 – 9 dana).

Kod fenologije odbacivanja lista u jesenskom razdoblju, koja je mjerena u jednom danu, fenofaze su razvrstane prema postocima odbacivanja lista odnosno fenofazama osutosti, stoga ranoj fenotipskoj grupi pripadaju klonovi kod kojih je u tom trenutku evidentirana promjena boje lista i početak osutosti krošnje stabala do 30 %. Kasnoj fenotipskoj grupi odbacivanja lista pripadaju klonovi kod kojih je trenutku mjerenja evidentirana osutost krošnje stabala od 30 – 100 % (ovisno o fenofazama).

Za analizu proljetne fenologije na devet klonova, na kojima su rađeni i testovi osjetljivosti, upotrebljavana je K-means klaster analiza koja je ukazala na rezultate prikazane (Tablica 33).



Tablica 33. Rezultati klaster analize za proljetnu fenologiju (K-means)

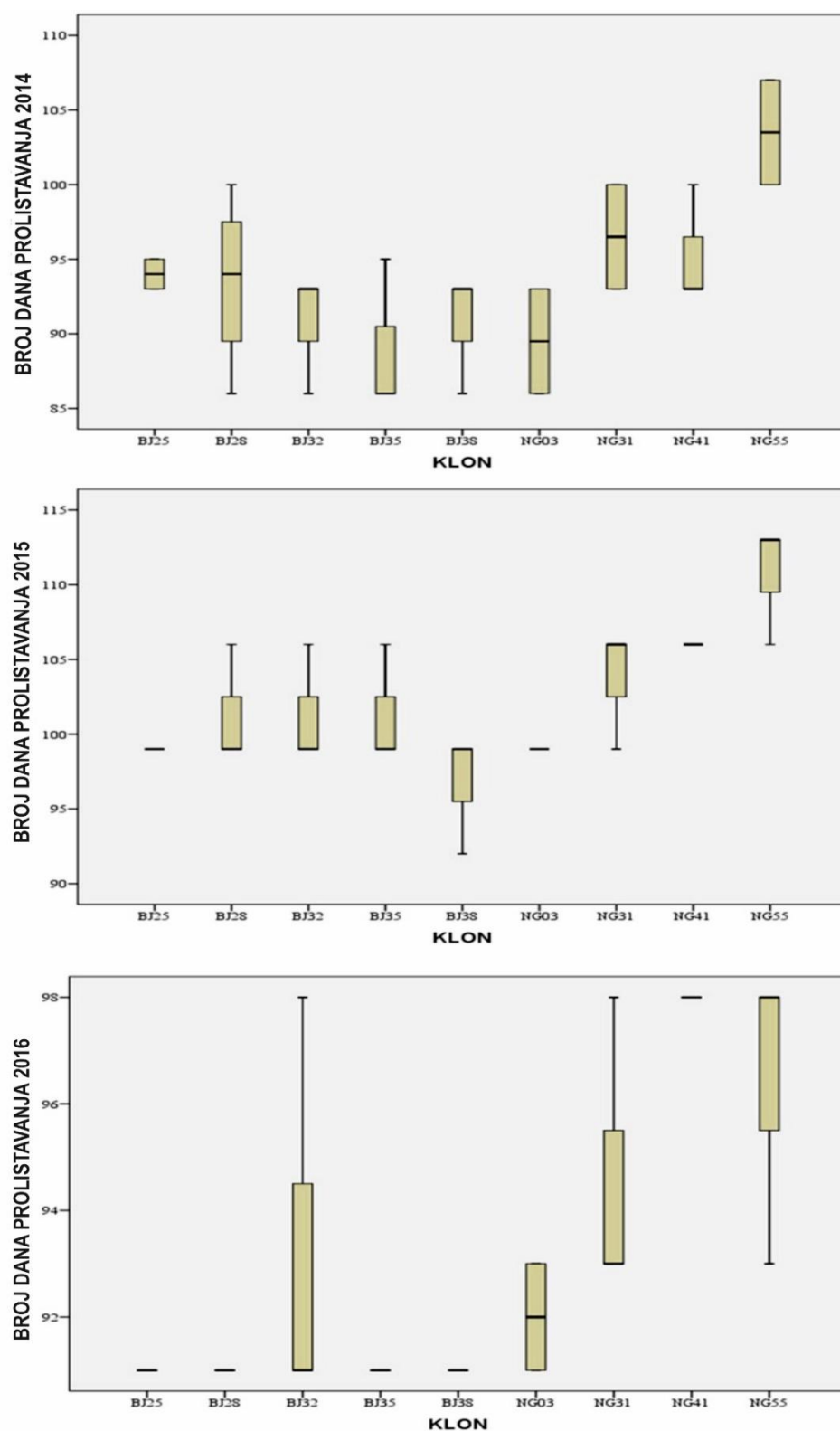
Table 33. Results of cluster analysis for spring phenology (K-means)

**Pripadnost klaster grupi (K-means)**

Case Number	KLON	Cluster	Distance
1	BJ25	1	6,587
2	BJ28	1	12,545
3	BJ32	1	10,119
4	BJ35	1	12,030
5	BJ38	1	9,525
6	NG03	1	6,860
7	NG31	2	11,101
8	NG41	2	11,441
9	NG55	2	15,402

Distribucija broja dana do ulaska u fazu 2 listanja za svaki klon u testiranju, prema godini mjerenja, također jasno navodi na zaključak da kod proljetne fenologije u grupu ranolistajućih fenotipa (klaster 1) spadaju klonovi BJ25, BJ28, BJ32, BJ35, BJ38 i NG03, dok u kasnu fenotipsku grupu (klaster 2) spadaju klonovi NG31, NG41 i NG55 (Tablica 33; Slika 73).

Povezivanjem rezultata testiranja osjetljivosti klonova i pripadajućih prosječnih vrijednosti duljina nekroza za svaki klon s klasterima fenotipskih grupa proljetne fenologije, utvrđeno je da nema povezanosti između duljina nekroza i fenotipskih grupa listanja poljskog jasena (Tablica 35).



Slika 73. Distribucija dana do prolistavanja za svaki klon u testiranju

Figure 73. Distribution of days till leaf unfolding for every tested clone

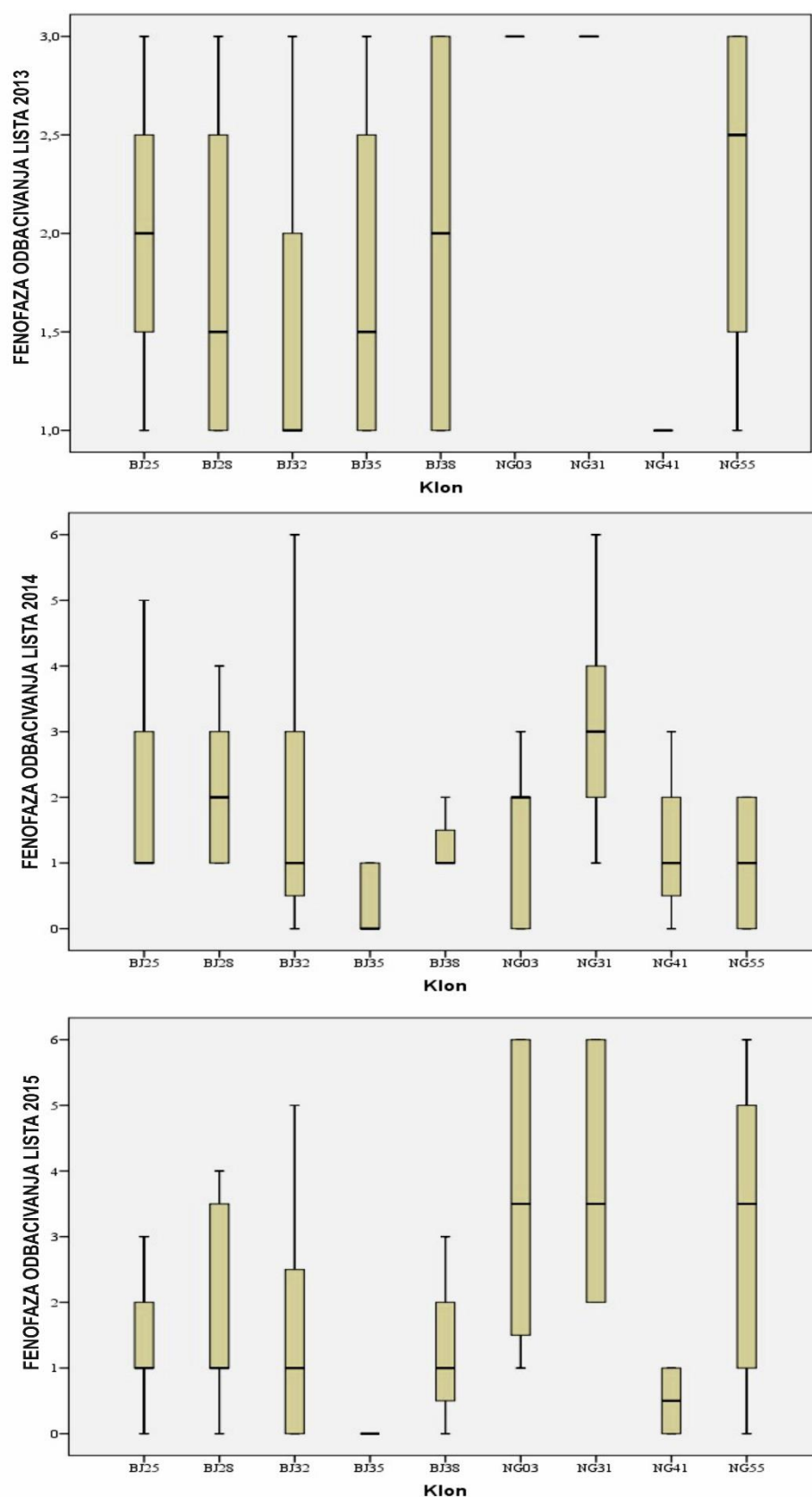
Za analizu jesenske fenologije na devet klonova, na kojima su rađeni i testovi osjetljivosti, upotrebljavana je K-means klaster analiza koja je ukazala na prikazane rezultate (Tablica 34).

Tablica 34. Rezultati klaster analize za jesensku fenologiju (K-means)

Table 34. Results of cluster analysis for autumn phenology (K-means)

**PRIPADNOST KLASER GRUPI (K-means)**

Case Number	klon	Cluster	Distance
1	BJ25	2	4,171
2	BJ28	1	6,047
3	BJ32	2	5,675
4	BJ35	2	4,775
5	BJ38	2	3,033
6	NG03	1	3,683
7	NG31	1	5,056
8	NG41	2	3,521
9	NG55	1	3,881



Slika 74. Distribucija fenofaza odbacivanja lista u jednom mjeranju za svaki klon u testiranju

Figure 74. Phenophase distribution of leaf shedding in one monitoring period for every tested clone

Distribucija fenofaza odbacivanja lista u jesen za svaki klon u testiranju, prema godini motrenja, također jasno navodi na zaključak da kod jesenske fenologije u ranu fenotipsku grupu (klaster 1) spadaju klonovi BJ28, NG03, NG31 i NG55, dok u kasnu fenotipsku grupu (klaster 2) spadaju klonovi BJ25, BJ32, BJ35, BJ38 i NG41 (Tablica 34; Slika 74).

Povezivanjem rezultata testiranja osjetljivosti klonova i pripadajućih prosječnih vrijednosti duljina nekroza za svaki klon s klasterima fenotipskih grupa jesenske fenologije, utvrđeno je da nema povezanosti između duljina nekroza s fenotipskim grupama odbacivanja lista poljskog jasena.

Analizom svih rezultata dobivenih fenološkim motrenjima (proljetne i jesenske fenologije) i usporedbom s duljinama nekroza razvijenim na istim klonovima u testovima osjetljivosti na poljskom jasenu, dobiveni su rezultati prikazani (Tablica 35).

Tablica 35. Rezultati usporedbe fenoloških istraživanja s testovima osjetljivosti klonova

Table 35. Comparison of phenological research results with results of susceptibility clone tests

KLON	PROLISTAVANJE	ODBACIVANJE LISTA	VEGETACIJSKI PERIOD	DULJINA NEKROZA
BJ25	Rano	Kasno	<b>Produljeni</b>	<b>Mala</b>
BJ28	Rano	Rano	SREDNJI	Velika
BJ32	Rano	Kasno	<b>Produljeni</b>	<b>Srednja</b>
BJ35	Rano	Kasno	<b>Produljeni</b>	<b>Srednja</b>
BJ38	Rano	Kasno	<b>Produljeni</b>	<b>Mala</b>
NG03	Rano	Rano	SREDNJI	Srednja
<b>NG31</b>	Kasno	Rano	<b>Skraćeni</b>	<b>Mala</b>
NG41	Kasno	Kasno	SREDNJI	Srednja
NG55	Kasno	Rano	<b>Skraćeni</b>	<b>Velika</b>

Tablica 36. Grupe različitih duljina vegetacijskog perioda s pripadnošću klonova

Table 36. Groups of different vegetation period lengths with clone affiliation

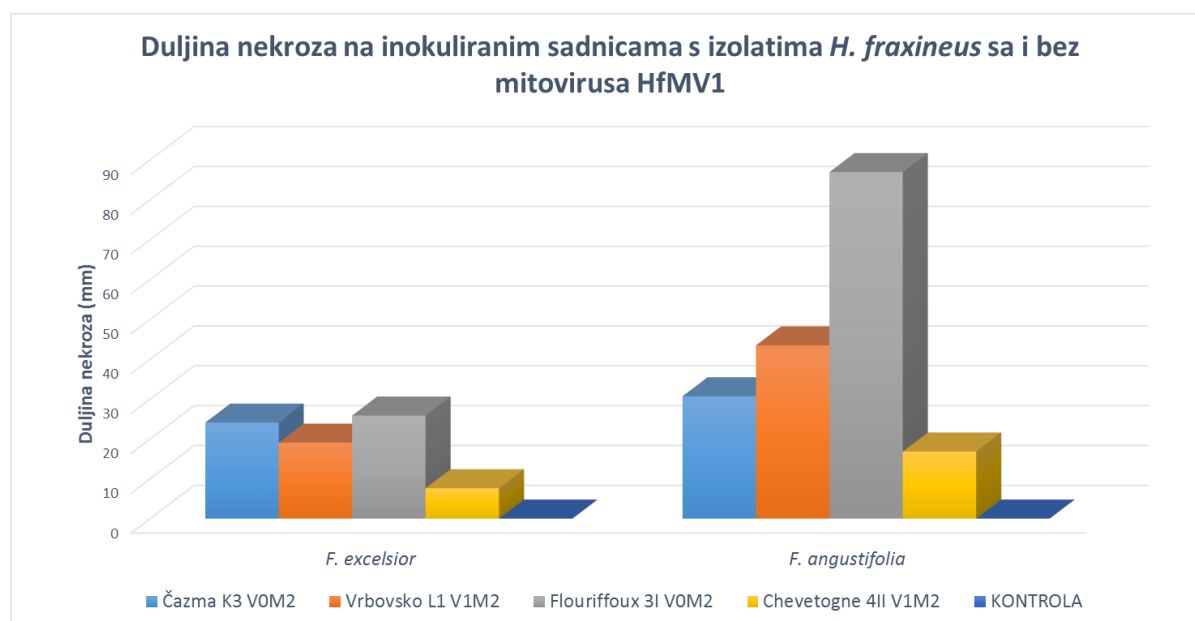
VEGETACIJSKI PERIOD	PROLISTAVANJE	ODBACIVANJE LISTA	KLON
PRODULJENI	Rano	Kasno	BJ25, BJ32, BJ35, BJ38
SREDNJI RANI	Rano	<b>Rano</b>	BJ28, <b>NG03</b>
SREDNJI KASNI	Kasno	Kasno	NG41
SKRAĆENI	Kasno	<b>Rano</b>	<b>NG31</b> , NG55

Duljina vegetacijskog perioda definirana je u četiri grupe s obzirom na proljetne podatke fenologije listanja i jesenske fenologije odbacivanja lista (Tablica 36). Sukladno rezultatima

utvrđeno je da trećina klonova ima normalnu duljinu vegetacijskog perioda (BJ28, NG03 i NG41) od kojih BJ28 i NG03 pripadaju ranoj ekotipskoj formi listanja dok NG41 pripada kasnoj ekotipskoj formi listanja. Rana ekotipska forma listanja pokazuje tendenciju srednjih do velikih duljina nekroza dok kasna ekotipska forma listanja ima veliku duljinu nekroza. Klonovi BJ25, BJ32, BJ35 i BJ38 prikazuju produljeni vegetacijski period, dok klonovi NG31 i NG55 prikazuju skraćeni vegetacijski period. Rezultati skraćenog vegetacijskog perioda poljskog jasena ne koreliraju s prosječnom duljinom nekroza, dok produljeni vegetacijski period ima tendenciju malih do srednjih duljina. Prema dobivenim rezultatima nema jake povezanosti između duljine nekroza s duljinom vegetacijskog perioda ili ekotipskom formom baziranom na fenologiji listanja.

#### **3.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena *Hymenoscyphus fraxineus***

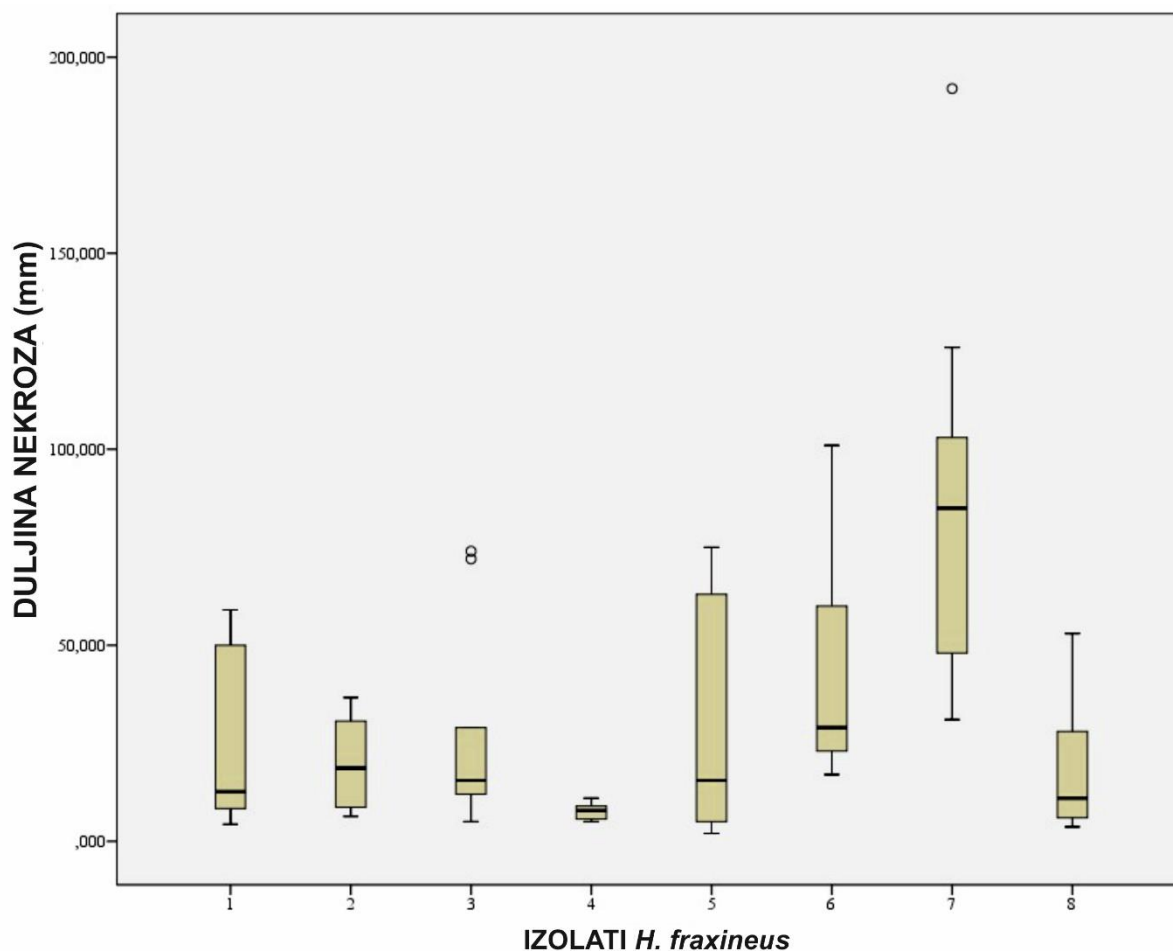
Iz grafa koji prikazuje rast nekroza na inokuliranim sadnicama običnog i poljskog jasena izolatima patogena *H. fraxineus* s i bez mitovirusa HfMV1 (Slika 75) iščitava se kako su kod običnog jasena izolati s HfMV1 virusom imali reducirani rast nekrotičnih lezija od izolata bez prisutnosti virusa. Kod poljskog jasena s obzirom na rezultate nije moguće donijeti isti zaključak. Hrvatski izolat pokazuje veći rast nekroza izolata s virusom, dok belgijski ukazuju na isti trend kao i kod običnog jasena, odnosno izolati s HfMV1 virusom imaju manje nekroze od izolata bez virusa. Kontrolne sadnice ostale su neinficirane tijekom istraživanja.



Slika 75. Duljina nekroza na umjetno inokuliranim sadnicama običnog i poljskog jasena s izolatima patogene gljive *H. fraxineus* sa i bez prisutnosti mitovirusa HfMV1

Figure 75. Necrosis length on artificially inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with isolates of pathogenic fungus *H. fraxineus* with and without the presence of the mitovirus HfMV1

Kod distribucije rasta nekrotičnih lezija na inokuliranim biljkama očitava se kako nekroze na poljskom jasenu su u istom vremenskom periodu motrenja (3 mjeseca) znatno veće u odnosu na obični jasen (Slika 76). Samim time i varijabilnost između izolata je veća nego kod običnog jasena.



Legenda: 1-Čazma K3 V0M2; 2-Vrbovsko L1 V1M2; 3-Flouriffoux 3I V0M2; 4-Chevetogne 4II V1M2; 5-Čazma K3 V0M2; 6-Vrbovsko L1 V1M2; 7-Flouriffoux 3I V0M2; 8-Chevetogne 4II V1M2

*Fraxinus excelsior*: 1-4; *Fraxinus angustifolia*: 5-8

Slika 76. Distribucija duljine nekroza na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena *H. fraxineus* sa i bez mitovirusa HfMV1

Figure 76. Distribution of necrosis length on inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with isolates of *H. fraxineus* with and without the mitovirus HfMV1

Da bi utvrdili postoje li statistički značajne razlike u rastu nekroza između vrsta domaćina (običnog i poljskog jasena) testirana je normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da nema normalnosti distribucije kod *F. excelsior* niti kod *F. angustifolia*. Budući da nema normalnosti distribucije radili smo neparametrijski Mann-Whitney U test koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika između vrsta domaćina, odnosno da su razlike u rezultatima posljedica vrste jasena.



Kruskal-Wallis H test za nezavisne uzorke pokazao je da postoji statistički značajna razlika u rastu nekroza na običnom jasenu s obzirom na izolate  $\chi^2(3) = 7.849$ ,  $p = 0.049$  (Tablica 37). Da bi utvrdili između kojih izolata postoji statistički značajna razlika pokrenut je Post hoc Dunn-Bonferroni test gdje je Dunn test pokazao razlike između izolata 4-1 (Chevetogne 4II V1M2 - Čazma K3 V0M2), 4-2 (Chevetogne 4II V1M2 - Vrbovsko L1 V1M2), 4-3 (Chevetogne 4II V1M2 - Flouriffoux 3I V0M2). Međutim Bonferroni korekcijom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između izolata na običnom jasenu, te da je Dunn test bio lažno pozitivan.

Kruskal-Wallis H test za nezavisne uzorke pokazao je da postoji statistički značajna razlika u rastu nekroza na poljskom jasenu s obzirom na izolate  $\chi^2(3) = 17.336$ ,  $p = 0.001$  (Tablica 37). Post hoc Dunn-Bonferroni utvrdio je da statistički značajna razlika postoji između izolata 4-3 (Chevetogne 4II V1M2 - Flouriffoux 3I V0M2) i 1-3 (Čazma K3 V0M2 - Flouriffoux 3I V0M2) na poljskom jasenu.

Tablica 37. Rezultati statističke analize za duljinu nekroza na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena *H. fraxineus* sa i bez mitovirusa HfMV1

Table 37. Results of statistical analysis for necrosis length on inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with isolates of *H. fraxineus* with and without the mitovirus HfMV1

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Vrsta	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RAST	1 FE	0,246	40	0,000	0,741	40	0,000
NEKROZA	2 FA	0,154	40	0,018	0,861	40	0,000

a. Lilliefors Significance Correction

SAŽETAK TESTA HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of RAST NEKROZA is the same across categories of VRSTA.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,003	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

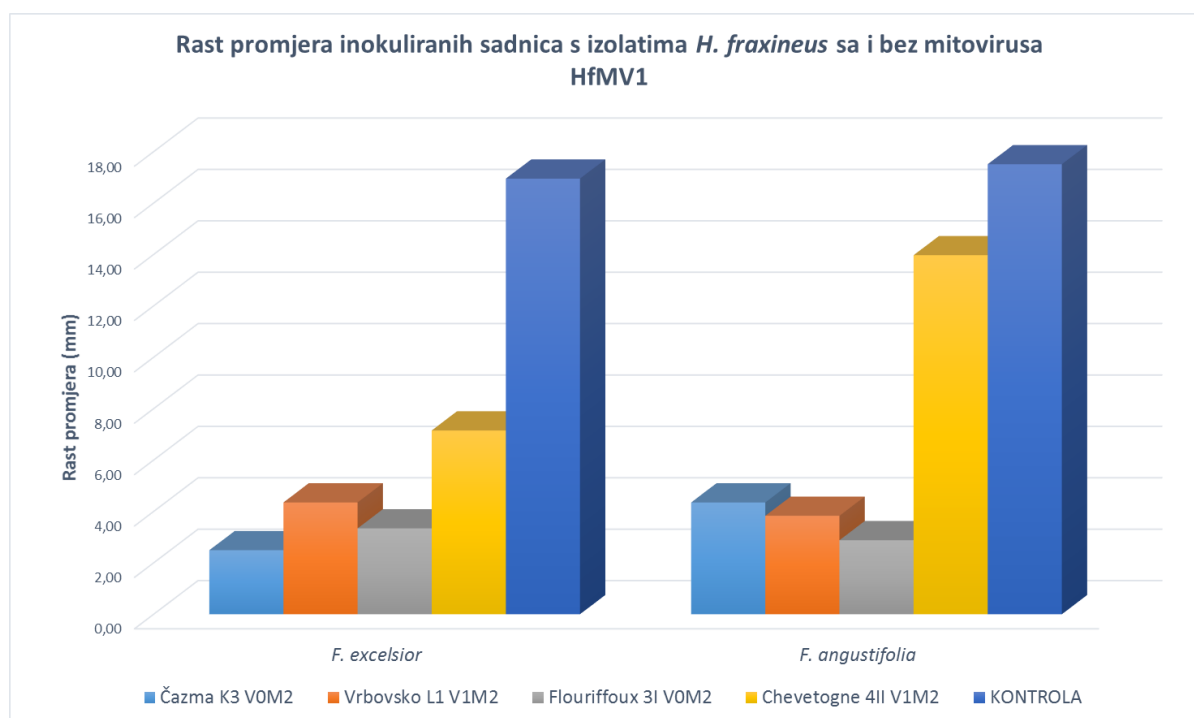
SAŽETAK TESTA HIPOTEZE OBIČNI JASEN				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of RAST NEKROZA is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,049	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

SAŽETAK TESTA HIPOTEZE POLJSKI JASEN				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Growth is the same across categories of Lokacija.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,001	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

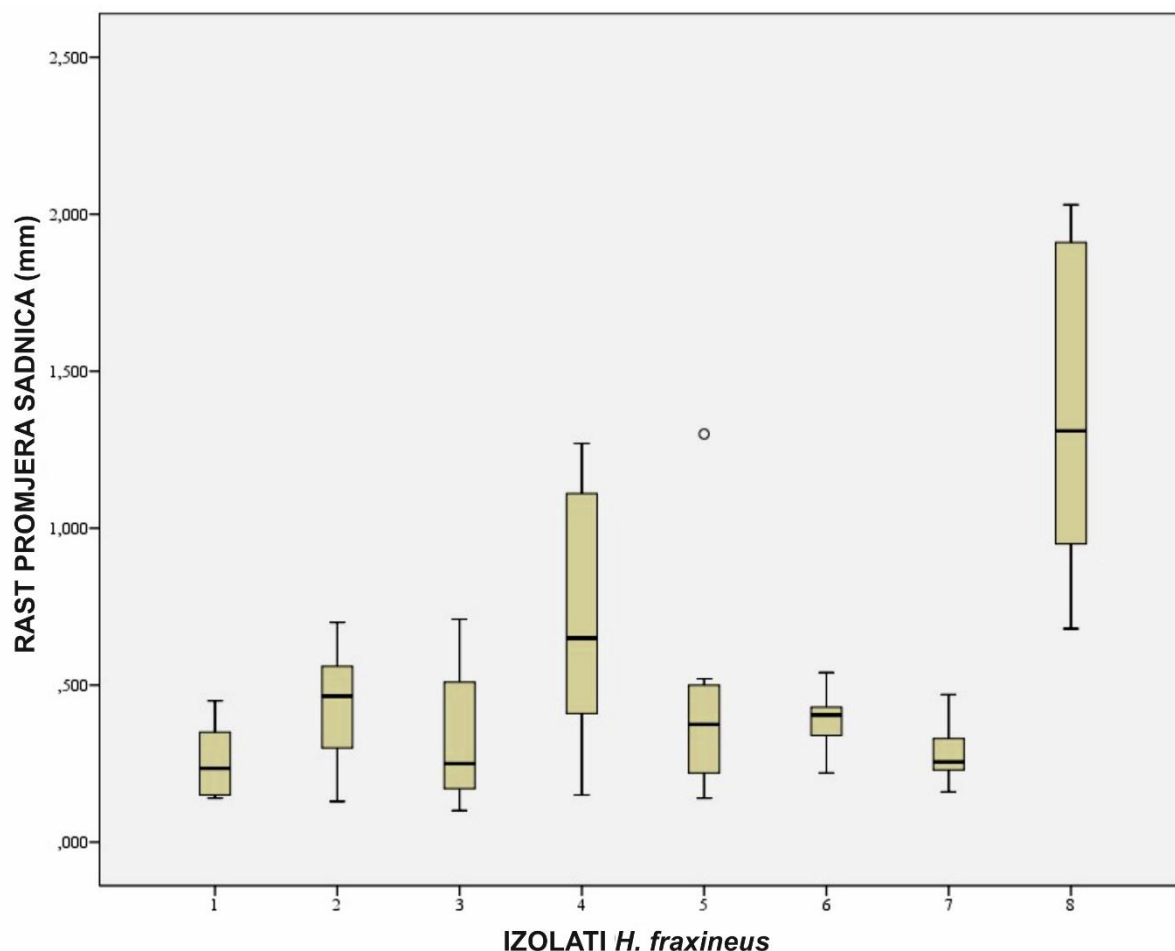
Rast promjera inokuliranih sadnica korelira s vrijednostima veličine nekroza, što su veće nekroze rast promjera je manji (Slika 75; Slika 77). Postoji značajna redukcija promjera inficiranih sadnica s patogenom *H. fraxineus* u odnosu na neinficirane kontrolne sadnice (Slika 77). Redukcija promjera sadnica iznosi od 20.22 – 85.31% u vremenskom periodu motrenja od tri mjeseca tijekom ljetnog vegetacijskog razdoblja.



Slika 77. Rast promjera umjetno inokuliranih sadnica običnog i poljskog jasena s izolatima gljive *H. fraxineus* sa i bez mitovirusa HfMV1

Figure 77. Diameter growth of artificially inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with fungal *H. fraxineus* isolates with and without the presence of the mitovirus HfMV1

Također na grafu distribucije rasta promjera na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena može se iščitati velika varijabilnost u rastu između inficiranih i neinficiranih sadnica (Slika 78).



Legenda: 1-Čazma K3 V0M2; 2-Vrbovsko L1 V1M2; 3-Flouriffoux 3I V0M2; 4-Chevetogne 4II V1M2; 5-Čazma K3 V0M2; 6-Vrbovsko L1 V1M2; 7-Flouriffoux 3I V0M2; 8-Chevetogne 4II V1M2

*Fraxinus excelsior*: 1-4; *Fraxinus angustifolia*: 5-8

Slika 78. Distribucija rasta promjera na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena *H. fraxineus* sa i bez mitovirusa HfMV1

Figure 78. Distribution of diameter growth on inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with isolates of *H. fraxineus* with and without the mitovirus HfMV1

Da bi utvrdili postoje li statistički značajne razlike u rastu promjera između vrsta domaćina (običnog i poljskog jasena) testirana je normalnost distribucije ( $p > 0.05$ ) Shapiro-Wilkovim testom koji je ukazao da nema normalnosti distribucije kod *F. excelsior* niti kod *F. angustifolia*. Budući da nema normalnosti distribucije radili smo neparametrijski Mann-Whitney U test koji je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika između rasta promjera na vrstama domaćina.

Kruskal-Wallis H test za nezavisne uzorke pokazao je da postoji statistički značajna razlika u rastu promjera na običnom jasenu s obzirom na izolate  $\chi^2(3) = 11.462$ ,  $p = 0.009$  (Tablica 38). Da bi utvrdili između kojih izolata postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) pokrenut je Post hoc Dunn-Bonferroni test gdje je pokazao razlike između izolata 1-4 (Čazma K3 V0M2 - Chevetogne 4II V1M2). Kruskal-Wallis H test za nezavisne uzorke pokazao je da postoji statistički značajna razlika u rastu promjera na poljskom jasenu s obzirom na izolate  $\chi^2(3) = 22.425$ ,  $p = 0.000$  (Tablica 38). Post hoc Dunn-Bonferroni utvrdio je da statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) postoji između izolata 3-4 (Flouriffoux 3I V0M2 - Chevetogne 4II V1M2), 1-4 (Čazma K3 V0M2 - Chevetogne 4II V1M2) i 2-4 (Vrbovsko L1 V1M2 - Chevetogne 4II V1M2) na poljskom jasenu.

Da bi utvrdili postoje li statistički značajne razlike između pojedinih izolata i pripadajuće kontrole upotrijebili smo Mann-Whitney U test za nezavisne uzorke koji je pokazao da svi izolati se kod običnog jasena značajno statistički razlikuju ( $p < 0.05$ ) od kontrolne skupine za svojstvo rasta promjera. Također Mann-Whitney U test je upotrijebljen za testiranje postoji li statistički značajna razlika između pojedinih izolata i kontrolne skupine kod poljskog jasena. Test je utvrdio da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između kontrolne skupine i izolata 1 (Čazma K3 V0M2), 2 (Vrbovsko L1 V1M2) i 3 (Flouriffoux 3I V0M2), dok izolat 4 (Chevetogne 4II V0M2) se značajno ne razlikuje od kontrolne skupine ( $p = 0.165$ ).

Tablica 38. Rezultati statističke analize za rast promjera na inokuliranim biljkama običnog i poljskog jasena izolatima patogena *H. fraxineus* sa i bez mitovirusa HfMV1

Table 38. Results of statistical analysis for diameter growth on inoculated seedlings of common and narrow-leaved ash with isolates of *H. fraxineus* with and without the mitovirus HfMV1

TEST NORMALNOSTI DISTRIBUCIJE							
	Vrsta	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rast_promjera	1 FE	0,158	40	0,013	0,867	40	0,000
	2 FA	0,288	40	0,000	0,753	40	0,000

a. Lilliefors Significance Correction

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Rast_promjera is the same across categories of Vrsta.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	0,192	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Rast_promjera is the same across categories of IZOLAT.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,009	Reject the null hypothesis.

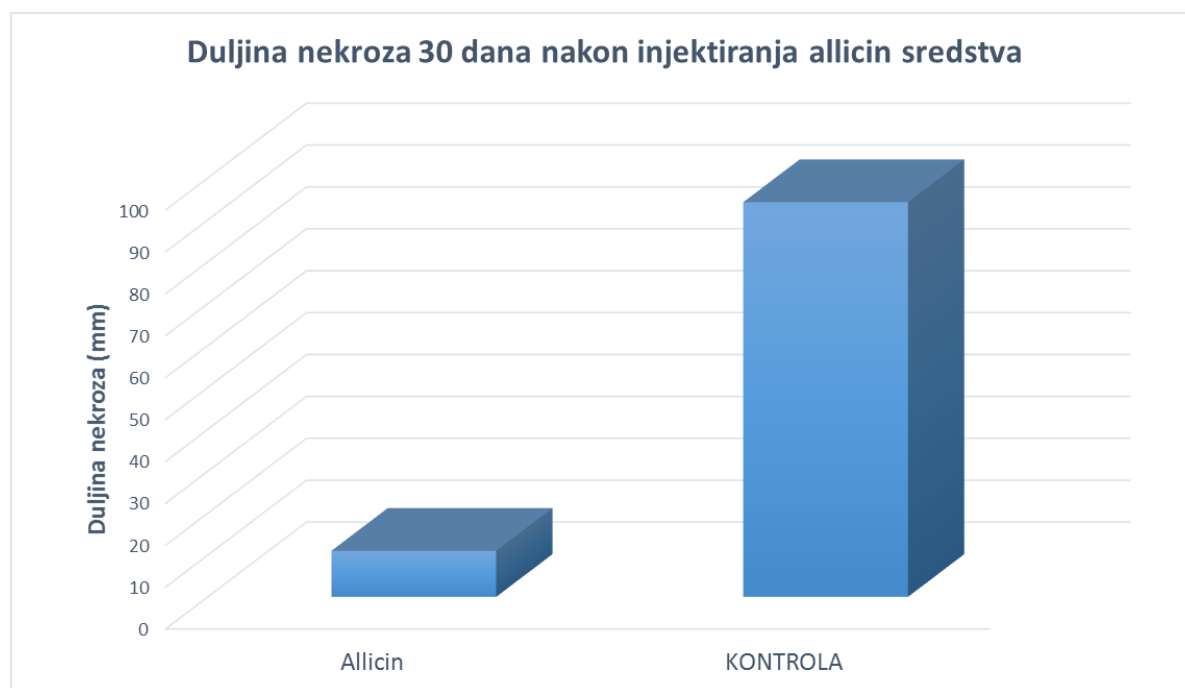
Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

SAŽETAK TESTNE HIPOTEZE				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Rast_promjera is the same across categories of IZOLAT.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is 0,05.

### 3.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva

Iz rezultata se može iščitati kako je Allicin sredstvo značajno reduciralo rast nekroza u odnosu na kontrolnu skupinu. Sredstvo nije zaustavilo rast nekroza u razdoblju praćenja od 30 dana (Slika 79). U rastu nekroza utvrđeno je da su nekroze u rastu prema gore stagnirale, dok su nastavile svoj rast u smjeru prema bazi stabljike.



Slika 79. Duljina nekroza 30 dana nakon injektiranja Allicin sredstva zaštite bilja u sadnice *F. angustifolia* prethodno umjetno inokulirane patogenom *H. fraxineus* (testiranje *in vivo*)

Figure 79. Necrosis lenght 30 days after injecting the Allicine plant protection agent in the seedlings of *F. angustifolia* previously artificially inoculated with *H. fraxineus* pathogen (testing *in vivo*)

Da bi utvrdili postoji li statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između alternativnih sredstava i kontrolne grupe za svojstvo rasta nekroza upotrijebili smo Wilcoxon Signed Ranks test koji je utvrdio da se rast nekroza kod svih tretiranih biljaka Allicin sredstvom značajno razlikuje od netretiranih kontrolnih biljaka ( $p = 0.043$ ).

## 4. RASPRAVA

### 4.1. *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

#### 4.1.1. Rasprostranjenost i širenje patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u šumskim ekosustavima Hrvatske

Gljivični patogen *H. fraxineus* prisutan je u Republici Hrvatskoj od prvog nalaza 2009. godine na području Nastavno pokusnog šumskog objekta Zalesina, Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Barić et al. 2012). Do početka 2016. godine, proširio se i etablirao na gotovo čitavom području areala rasprostranjenja običnog i poljskog jasena u Republici Hrvatskoj, što dokazuje i vremenski tijek pronalaska pozitivnih lokacija prisustva patogena u sastojinama jasena od 2009 - 2016. godine (Slika 27; Slika 28; Slika 30; Slika 29). Na temelju dosadašnjih spoznaja i kronoloških podataka možemo pretpostaviti da se bolest širila iz dva pravca. Prvi pravac širenja bolesti opisuje širenje od točke prvog nalaza prema južnim i jugo-istočnim dijelovima Gorskog kotara i Like, te istočno do nizinske Hrvatske uz tok rijeke Save, dok drugi pravac širenja predstavlja širenje od graničnih područja sjeverne Hrvatske prema unutrašnjosti Zagorja, te od Međimurja uz tok rijeke Drave prema jugu gdje u području Bjelovara i Čazme dolazi do spajanja oba pravca rasprostranjenja bolesti.

Glavni ekološki generalni preduvjeti s velikom statističkom korelacijom predikcije pojavnosti patogena *H. fraxineus*, su ljetne oborine, visoka vlažnost tla i niska temperatura zraka (Dal Maso & Montecchio 2014). Širenjem infekcije patogena *H. fraxineus* preko planinskih i gorskih područja infekcija se proširila do rubnog nizinskog područja gdje se uzduž toka rijeke Save nastavila širiti nizvodno do Vrbanje. Vrlo je vjerojatno da su tokovi rijeka prirodno održavali humidnost potrebnu za opstanak patogena i njegovo širenje (Dal Maso & Montecchio 2014). Gljivični patogen nije prisutan u termofilnim zajednicama na mediteranskom području rasprostranjenja crnog jasena, te u prirodnim sastojinama crnog jasena nema simptoma bolesti niti je moguća izolacija patogena iz tkiva potencijalnog domaćina, što je u skladu s predikcijom rizika prirodnog širenja gljive *H. fraxineus* (Dal Maso & Montecchio 2014; Santini et al. 2013).

Pojavom prvih pozitivnih nalaza na poljskom jasenu primijećeno je da su varijacije oštećenosti i vidljivost simptoma bolesti puno izraženije nego što je to zabilježeno ranije na običnom jasenu, kako unutar godine tako i između godina. Bio je potreban dulji period da se utvrdi da standardne metode izolacija nisu uvijek dovoljno uspješne za razliku od molekularnih metoda koje nam iz drvnih tkiva mogu dati nesumljivu dijagnozu prisutnost gljivične vrste (Chandelier et al. 2010).

Izolacija i detekcija patogena *H. fraxineus* u svom prirodnom arealu rasprostranjenja Gorske Hrvatske na običnom jasenu nikad nije bila sporna. Dok u nizinskom predjelu na poljskom jasenu rast i razvoj gljive te mogućnost izolacije ovisio ponajprije o aktivnom ili dormantnom (endofitnom) statusu gljive (Bakys et al. 2009a; Bakys et al. 2009b; Johansson et al. 2010), te o pogodnom vremenskom periodu sakupljanja uzoraka koji je ograničen na proljeće (travanj – prva polovica lipnja) i jesen (rujan – prva polovica listopada). Naglim skokom temperatura u nizinskom području ljeti, odnosno naglim padom temperatura u jesen zaustavlja se rast gljive te ona usporava svoje metaboličke procese i ulazi u fazu latencije. To je potvrđeno istraživanjima koji govore o endofitskom statusu patogena *H. fraxineus* (Bakys et al. 2009a; Bakys et al. 2009b), slabijem rastu i drugim morfološkim varijacijama patogena pod utjecajem visokih ili niskih temperatura (Kowalski & Bartnik 2010) kao i molekularne detekcije patogena u asimptomatskim tkivima (Ioos et al. 2009; Chandelier et al. 2010; Johansson et al. 2010; Pham et al. 2013). Izolacija gljive u dormantnom stadiju inaktivnosti je gotovo nemoguća. Budući da se u drvnom tkivu jasena nalazi skup drugih vrsta gljiva koje su aktivnije i brže u rastu od *H. fraxineus* na hranidbenoj podlozi, one inhibiraju rast gljive *H. fraxineus* ili njihove kulture prerastu kulture *H. fraxineus* u vrlo kratkom periodu, što čini izolacijski proces dobivanja čistih kultura patogena vrlo kompliciranim.

S obzirom da širenje patogene gljive ovisi o dostupnosti domaćina, njegovoj genetskoj predispoziciji, ali i o klimatskim povoljnim faktorima, širenje areala gljive *H. fraxineus* na poljskom jasenu nije proteklo brzo i neometano kao na običnom jasenu, međutim ipak je gljiva uspjela etablirati svoju kontinuiranu prisutnost u tom arealu. To se može iščitati iz projekcija vremenskog širenja bolesti obuhvaćenih ovim istraživanjem (Slika 27, Slika 28) napravljenih na osnovi konstantnog monitoringa i pozitivnih izolacija patogena u razdoblju od 2009. - 2016. godine. Aktivnost gljive je u nizinskim područjima smanjena na kratkotrajne okvire povoljnih vremenskih razmaka unutar vegetacijskog razdoblja, međutim s obzirom na virulentnost gljive i sposobnost rasta u povoljnim uvjetima, bez obzira koliko kratki oni bili, posljedične štete su i dalje značajne. To je dokazano testiranjem temperaturnih ograničenja izolata u ovom istraživanju kao i projekcijom procjena oštećenosti inficiranih sastojina (Slika 30). Daljnje širenje gljive prema jugu i prema istoku nije osobito vjerojatno s obzirom da u takvim područjima su registrirani u prethodnim godinama nepovoljni klimatski ekstremi za *H. fraxineus*. Moguće je širenje areala gljive ukoliko se zaredaju minimalno dvije godine s prosječnom nižim temperaturama zraka i obilnim padalinama posebice u ljetnom razdoblju. U narednom razdoblju u rubnim istočnim i južnim područjima Hrvatske moguća su dva



scenarija. Ukoliko se klimatske prilike vrte na 30 godišnji prosjek temperatura zraka i padalina, patogen se može trajno etablirati u tom području i vršiti značajne štete u sastojinama. Međutim, ukoliko se nastavi nedavno zabilježeni trend povećanja temperatura zraka i neravnomjernosti padalina, trajna etabliranja patogena u kontinuiranom razdoblju na tim područjima nisu vjerojatna, što dokazuje i istraživanje (Hauptman et al. 2013). Na temelju svega spomenutog i u skladu s predikciom rizika širenja bolesti (Del Maso & Montecchio 2014) Hrvatska je granična zemlja rasprostranjenja patogena *H. fraxineus* na čijem teritoriju su zadovoljeni preduvjeti za njegov rast i razvoj.

Smatra se da periferne mediteranske populacije jasena nisu bile izvorišne populacije za rekolonizaciju sjevernijih dijelova Europe nakon oledbe, već da su perzistirale *in situ* od posljednjeg ledenog doba pa sve do danas u relativno stabilnom okolišu mediteranske regije (Hampe & Petit 2005; Petit et al. 2005). Iako su periferne populacije obično male i imaju nižu genetičku raznolikost zbog dugotrajne izolacije, one su obično vrlo stare, genetički divergentnije i bolje adaptirane na lokalne, često suboptimalne okolišne uvjete (Petit et al. 2003; Hampe & Petit 2005). Stoga se često nazivaju i reliktnim populacijama koje posjeduju jedinstvenu genetičku raznolikost koja značajno doprinosi evolucijskom potencijalu vrste (Hampe & Petit 2005; Petit et al. 2005). Kako se prikupljaju znanstveni rezultati postalo je nedvojbeno da trenutne klimatske promjene uzrokuju gubitak povoljnog staništa za biljne i životinjske vrste, što može dovesti do promjena i pomaka u njihovoj rasprostranjenosti (Parmesan & Yohe 2003; Parmesan 2006). Međutim, ne znači nužno da će sve regije svijeta biti jednako pogođene gubitkom staništa, a osjetljivost pojedine regije na klimatske promjene primarno ovisi o njoj regionalnoj klimi i topografiji. Primjerice, Mediteranska regija istaknuta je kao jedno od najranjivijih područja. Predviđa se da će ekosustavi Mediterana biti iznimno pogođeni klimatskim promjenama zbog povećanja temperature i poremećaja u oborinskom režimu (smanjenje oborina, češći oborinski ekstremi, tendencija prema sušoj klimi i izražen proces desertifikacije) (IPCC 2007; Giorgi & Lionello 2008; Lindner et al. 2010). Sukladno tome, moguće je da će klimatske promjene i nadolazeći temperaturni ekstremi potisnuti patogena iz populacija poljskog jasena i u našem graničnom području rasprostranjenja i eradificirati ga, možda čak i potisnuti čitavu vrstu poljskog jasena u migraciju prema sjevernijim krajevima. U svakom slučaju moguće su velike fluktuacije u aktivnosti i prisustvu patogena u nizinskim područjima Hrvatske.

#### 4.1.2. Osutost stabala

Vitalitet stabla možemo definirati kao sposobnost stabla da asimilira, preživi stres i reagira na promjenu okolišnih uvjeta. Više čimbenika utječe na vitalitet stabala, a razloge za pogoršanje stanja određenih vrsta drveća ili sastojina moramo tražiti u specifičnim interakcijama čimbenika stresa. Zajedničko obilježje stresa je neekonomično korištenje hraniva, energije i vode, koje vodi promjenama u alokaciji elemenata u drveću, tlu kao i na razini ekosustava.

Procjena stanja krošanja je od posebnog značaja za ICP Forests, a osutost je najvažniji, iako nespecifični indikator vitaliteta stabala (osobno priopćenje Potočić, 2017).

Osutost stabala se može mijenjati iz godine u godinu i naglo će porasti uslijed jakog stresa. Stabla se mogu oporaviti od gubitka lisne mase, pri čemu razdoblje povratka na vrijednosti prije stresa ovise kako o vrsti drveća tako i o okolišnim uvjetima, stoga ne možemo povezivati svaki porast osutosti s trajnim smanjenjem vitaliteta. Ponekada se dovodi u pitanje je li osutost valjan pokazatelj vitaliteta stabala (Kandler 1988, Ellenberg 1994). Rezultati Dobbertina i Branga (2001) pokazuju kako je osutost stabala procijenjena u koracima od 5% koristan parameter za predviđanje godišnjeg mortaliteta. U isto vrijeme, osutost krošanja je posljedica stanja stabala iz nekoliko proteklih godina rasta, što može zasmetati ako se osutost koristi kao indikator stresa za procjenu trenutačnog vitaliteta (Polak et al. 2006).

Oštećenost sastojina jasena većinom prati vremenski period trajanja bolesti na određenom području. Zbog toga su jako oštećene sastojine upravo sastojine običnog jasena na lokacijama na kojima se u Hrvatskoj bolest najranije pojavila (Goranska Dobra 23A, Petehovac 22A i Pernari). Umjerena osutost zabilježena je u srednjoj i nizinskoj Hrvatskoj (Vrbanjske šume 27B, Grede Kamare 39B, Josip Kozarac 71D, Josip Kozarac 199G, Ključevi 23C, Čazmanske nizinske šume 20B) što korelira s relativno kratkim vremenskim periodom prisustva bolesti, kao i s neprimjerenim klimatskim okolnostima koji otežavaju djelovanje gljivičnog patogena. Iznimka su lokacije Belevine 11A i Belevine 10B koje se nalaze na području Nastavno pokusno šumskog objekta Zalesina, Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te koje imaju umjerenu osutost sastojine iako se radi o najstarijim potvrđenim lokacijama prisustva bolesti, te Ivanščica L5 koja se nalazi u gorskom planinskom pojasu. Umjerena osutost sastojine u Zalesini rezultat je eliminiranja suhih stabala jasena iz sastojine, dok Ivanščica L5 predstavlja realnu sliku umjerene oštećenosti sastojine jer se radi o planinskoj lokaciji iznad 1000 m nadmorske visine s značajnom odgodom vremenskog perioda u odnosu na prvi nalaz

patogena u Hrvatskoj. Blaga oštećenost sastojine zabilježena je na lokacijama Kragujna 70B, Vrapčana 1 i Žumberak – Samoborsko gorje, što također korelira s kratkim periodom pojave bolesti. Blaga osutost stabala u krajnjem istočnom dijelu nizinske Hrvatske je logična budući da je to rub rasprostranjenja bolesti i radi se o području najrecentnije zahvaćenog infekcijom. Područje blage osutosti u Parku prirode Žumberak može se objasniti vrlo niskim udjelom običnog jasena u smjesi vrsta, bez mogućnosti velikog infekcijskog pritiska gljive.

#### **4.1.3. Povezanost osutosti stabala s infekcijskim potencijalom patogena**

Kod običnog jasena kao i kod poljskog jasena pokazala se značajna pozitivna korelacija između broja apotecija (neovisno o mjesecima) i oštećenosti sastojina. Jaka osutost krošanja običnog i poljskog jasena je povezana s visokim infekcijskim potencijalom patogena u određenom razdoblju. Također korelacija je ukazala da infekcijski potencijal gljive u sastojini prati stupanj oštećenosti pojedine sastojine. Korelacije u broju apotecija po mjesecima praćenja ukazuju da se broj apotecija mijenja po mjesecima unutar vrste ovisno o nekom trećem faktoru koji se mijenja s obzirom na mjesec mjerenja (najvjerojatnije temperature zraka i padalina).

Prosječan broj apotecija po mjesecima (Slika 31), ukazuje da su varijacije kod poljskog jasena drastično velike što je vjerojatno uvjetovano recentnijom pojavom bolesti i ekstremnijim nepogodnim klimatskim uvjetima, dok su kod običnog jasena podaci uniformniji i prate identični uzorak, što znači da su varijacije u broju apotecija po mjesecima mnogo manje nego kod poljskog jasena. Također se slični zaključci mogu izvesti iz grafičkog prikaza procjene oštećenosti sastojina gdje se očitava da obični jasen ima uniformniju jaču oštećenost sastojina dok kod poljskog jasena ona poprilično varira ovisno o lokaciji.

U testiranju razlika između lokacija, lokacija 7 (G.J. Ključevi – 23C) pokazuje signifikantnu statističku razliku s lokacijama Vrapčana1, Grede kamare 39B, Josip Kozarac 71D, Josip Kozarac 199G, Čazmanske nizinske šume 20B, Ivanščica L5 i Žumberak – Malinci. Drastično odstupanje produkcije apotecija na lokaciji Ključevi 23C od ostalih obližnjih lokacija poljskog jasena mora biti uvjetovano lokalnim specifičnim uvjetima mikrolokaliteta, što zahtjeva detaljnija praćenja u budućnosti. Budući da produkcija apotecija ovisi o meteorološkim uvjetima u datom momentu, lokacije s približno istim klimatskim prilikama trebale bi pokazivati slične podatke (Slika 31). Lokacije u predjelu Gorske Hrvatske za ljetnih mjeseci (manje oborina i više temperature) pokazuju pad broja apotecija dok u nizinskoj Hrvatskoj imamo porast apotecija čiji uzrok može biti povećanje oborina tijekom ljetnih

mjeseci ili posljedica smanjenog broja apotecija u lipnju zbog toplotnog udara i niskih padalina. Za bolju predikciju i utvrđivanje stvarnih faktora glavnih utjecaja produkcije apotecija potreban je dulji period mjerenja. Prema dobivenim podacima jasno je da na produkciju apotecija ne utječu vrste jasena, da osutost stabala/oštećenost sastojina korelira s infekcijskim potencijalom gljive neovisno o vrsti jasena, te da broj apotecija ovisi o mjesecu uzorkovanja.

Pojedine lokacije imale su vrijednost nula, odnosno nisu imale produkciju apotecija u intervalu mjerenja što je također utjecalo na rezultat. Razlog tome su najvjerojatnije klimatske prilike nepovoljne za fruktifikaciju gljive (previsoke temperature zraka i niska vlaga zraka). Također, lokacije koje se nalaze na perifernom dijelu rasprostranjenosti bolesti, lokacije s učestalim plavljenjem i zatrpavanjem rahisa riječnim muljem i izolirane lokacije sa slabim intenzitetom oštećenja sastojina i kratki period motrenja utječu na rezultat. Da bi se dobila snažnija korelacija potrebno je vršiti monitoring duži niz godina gdje bi tada imali više podataka i o oštećenosti sastojina i o produkciji apotecija. Osutost krošanja sastojine nije se mijenjala u kratkom periodu motrenja, stoga je potreban duži vremenski period motrenja koji bi dao podatke o razvoju oštećenosti.

## **4.2. Istraživanja izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus***

### **4.2.1. Identifikacija *Hymenoscyphus fraxineus* i ostalih izoliranih gljiva**

Vrste gljiva koje su bile najčešće izolirane iz tkiva jesena kod nas osim vrste *H. fraxineus* poklapaju se s vrstama gljiva koje su inače prema drugim autorima i ranije nalažene u tkivima *F. excelsior* uz gljivičnog patogena *H. fraxineus* (Przybył 2002; Lygis et al. 2006; Hauptman 2013). Vrlo malo podataka ima o populacijama gljiva koje naseljavaju drvena tkiva *F. angustifolia* (Hauptman 2013), te su se većina autora bazirala u istraživanjima na gljive u tkivima *F. excelsior* (Przybył 2002; Lygis et al. 2006). Sukladno našim rezultatima nisu se ukazale značajne razlike u pojavnosti vrsta gljiva između domaćina, već većinom iste vrste gljiva ili isti rodovi naseljavaju tkiva običnog i poljskog jasena. Izuzetak je vrsta *Hysterographium fraxini* koja je nađena samo na poljskom i crnom jasenu, te *Fusarium solani* i *Bionectria ochroleuca* koje su nađene samo na poljskom jasenu. Gljiva *Hysterographium fraxini* izolirana je iz drvnog tkiva tanjih grančica i izbojaka, *Fusarium solani* iz drvnog tkiva baze debla, a *Bionectria ochroleuca* iz drvnog tkiva izbojaka.

I drugi autori u svojim istraživanjima navode prisutnost istih vrsta gljiva te spominju njihovu nerazjašnjenu ulogu u trenutnom odumiranju jasena (Przybyl 2002; Lygis et al. 2005; Davydenko et al. 2013). Neki autori u svojim istraživanjima potvrđuju visoku mogućnost drugih gljivičnih patogena koji potpomažu ili samostalno uzrokuju odumiranje jasena kao što je gljiva *Nectria galligena* Bres. (Narbutas & Žuklys 1961), *Nectria coccinea* Desm. (Juodvalkis & Vasiliauskas, 2002), *Hysterographium fraxini* (Pers.) De Not., *Phoma exigua* Desm., *Phomopsis* spp. (Boudier 1994; Grzywacz 1995) i *Diplodia mutila* Fr. & Mont. (Przybyl 2002).

Neke od najčešćih izoliranih vrsta iz stabljika biljaka *F. excelsior* u Litvi bile su *Armillaria cepistipes*, *Trichoderma viride*, *Hypocrea pachybasioides*, *Leptodontidium elatinus*, *Ascoryne sarcoides*, *Nectria viridiscens*, *Cadophora malorum*, *Phoma exigua*, *Botryosphaeria stevensii*, *Fusarium solani* i *Ilyonectria radicularis* (Lygis et al. 2006). Dok u drugom istraživanju (Przybyl 2002) kao najčešće kohabitatne gljive navodi *Cladosporium cladosporoides*, *Cytospora populina*, *Discula* sp., *Gibberella baccata*, *Fusarium solani*, *Phoma* sp., *Phomopsis scobina*, *Phomopsis velata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Phoma exigua*, *Hysterographium fraxini*, *Alternaria alternata*, *Mortierella* sp., *Chaetophoma* sp., *Cadophora melinii*, *Coniothyrium olivaceum*, *Penicillium* sp., *Didymella macrostoma*, *Cladosporium macrocarpum*, *Cladosporium herbarum*, *Coniothyrium* sp., *Endocoryneum loculosum* i *Sordaria fimicola*. Među njima kao najpatogenije autor navodi gljive *Botryosphaeria stevensii*, te *Hysterographium fraxini* i *Phoma exigua* koje su u ovom istraživanju također izolirane iz tkiva jasena (Przybyl 2002). Također autori spominju da su moguća i sušenja jasena koja uzrokuju neke druge prateće gljive osim *H. fraxineus*, kao što su *Verticillium dahliae*, *Aureobasidium apocryptum* i *Neonectria ditissima* (Schröder & Dujesiefken 2001).

#### **4.2.2. Morfološka tipizacija izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (fenotipizacija izolata)**

##### **Morfološka tipizacija izolata prema izgledu micelija u kulturi**

Čiste kulture *C. fraxinea* izolata koje su rasle *in vitro* pokazuju značajnu varijabilnost, posebice u boji, strukturi, formaciji dijelova micelija, sporulaciji, pseudoparenhimskoj stromi i proizvodnji sekundarnih kapljičnih metabolita. Glavna obilježja utvrđena u kulturi bila su boja micelija (bijela, narančasta, bijela s narančastim segmentima, žuta), oblik micelija (okrugli, ovalni, nepravilan), oblik ruba micelija (puni, isprekidani), formiranje fialida

(pojavnost, nepojavnost), produkcija sekundarnih metabolita (viridin) (pojavnost, nepojavnost). Slične rezultate velike varijabilnosti izolata dobivene su i u drugim istraživanjima (Kowalski & Bartnik 2010). U istom istraživanju utvrđeno je da formaciju hijalinih ili bijelih kolonija i produkciju stroma uvjetuju niske temperature, dok formaciju kompaktnijih, rđavo-narančasto-smeđih kolonija uvjetuju više temperature. U ovom istraživanju morfološke diferencijacije procijenjivane su na izolatima koji su rasli na optimalnoj temperaturi od 20 °C. Utvrđena su dva glavna morfotipa gdje je morfotip2 mnogo veći s mnogo više razgranatih struktura subdivizija (8 grananja) od morfotipa1 (2 grananja). Glavna obilježja koja generalno karakteriziraju morfotip 1 su: bijela boja micelija, nepravilan oblik micelija, isprekidani rub micelija, neformiranje fijalida, bez vizualne prisutnosti produkcije sekundarnih metabolita. Glavna obilježja koja generalno karakteriziraju morfotip 2 su: bijela i narančasta boja micelija (50:50), okrugli i ovalni oblik micelija, puni rub micelija, neformiranje fijalida, s vizualnom prisutnošću produkcije sekundarnih metabolita. Morfološki najbližiji izolati pokazali su se izolati 15-30, 11-31, 10-32, 14-29. Dok morfološki najudaljeniji od svih ostalih izolata su izolati koji pripadaju morfotipu1 (izolati 3, 17 i 8).

Boja čistih kultura uvjetovana je i intenzitetom konidijske sporulacije koja je favorizirala niže temperature prema istraživanju (Kowalski & Bartnik 2010). Čiste kulture prilikom sporulacije postaju maslinasto-zelene (Kirisits et al. 2008). Informacije o morfološkoj varijaciji čistih kultura *C. fraxinea* mogu biti izuzetno korisne za brzu identifikaciju patogena u kulturi. Formacija sektora i demarkacionih zona u kulturi mogu označavati prisutnost više od jedne gljivične vrste. Međutim, morfološke sličnosti subkultura koje su rasle iz inokuluma uzetog iz određenog sektora, podržava njihovo grupiranje u isti takson (Kowalski & Bartnik 2010). Neki od modela razvoja *C. fraxinea in vitro* mogu se objasniti njenom biologijom *in vivo*. Fijalide i konidije gljive *C. fraxinea* se formiraju *in vivo* na mrtvim jasenovim stabljikama sporadično (Kirisits et al. 2008; Kowalski 2009; Kowalski & Holdenrieder 2009a). Međutim, one se formiraju u velikim količinama na rahisima otpalih listova, u listincu, u jesen, pri nižim temperaturama. Crni stromatski slojevi micelija se formiraju na rahisu otpalih listova. Pseudoparenhimska stroma koja se formira *in vitro* može biti ekvivalent stromatskim slojevima formiranim *in vivo* (Kowalski 2006; Kirisits et al. 2009; Kowalski & Holdenrieder 2009b). Neki izolati *C. fraxinea* produciraju sekundarne metabolite u obliku bijelih kristalnih tvari (Kowalski & Bartnik 2010). (Grad et al. 2009) u svom istraživanju otkriva da su te tvari viridin i viridiol. Te su tvari vrlo povezane, viridiol je dihidroderivat viridina (Reino et al. 2007), a u prirodi ova dva spoja imaju različita svojstva. Viridin je izuzetno mikotoksičan s

velikom aktivnošću djelovanja protiv nekih vrsta gljiva (Hutchinson 1999), dok je viridiol fitotoksičan (Howell & Stipanovic 1994). Fitotoksična aktivnost viridiola primijećena je kod sadnica jasena, na stabljikama i lišću (Andersson et al. 2010; Grad et al. 2009). Viridin je odgovoran za kreiranje inhibicijskih zona oko kultura *C. fraxinea* u mješovitim kulturama. Ponekad te inhibicijske zone mogu zaštititi kulturu *C. fraxinea* od preraštanja drugih brzorastućih gljiva (Grad et al. 2009; Kowalski & Holdenrieder 2009a).

### **Morfološka tipizacija izolata prema rastu kulture pri različitim temperaturama**

Grafikon prosječnog rasta izolata prikazuje da niske i visoke temperature podjednako utječu na rast izolata u različitim klimatskim uvjetima na primjeru hrvatskih i belgijskih izolata. Niske temperature djeluju inhibitory na rast, a visoke temperature djeluju inhibitory i sterilizirajuće. Temperature na 10 °C drastično su smanjile rast izolata, te su izolati rasli od 0,73–43,10 puta sporije nego na 20 °C. Svi izolati su najbrže rasli pri temperaturi od 20 °C i to se pokazalo kao idealna temperatura rasta što je već ranije utvrđeno istraživanjem (Kowalski & Bartnik 2010). Niti jedan izolat nije rastao na temperaturi od 30 °C što dokazuje da temperature iznad 30 °C u prirodi djeluju kao svojevrsan inhibitor rasta, ali i kao sterilizator. Vraćanjem izolata s 30 °C na 20 °C (30/20 °C) u razdoblju od dva tjedna utvrdila se stopa mortaliteta izolata koja je iznosila 30,3% prosječno za sve izolate, odnosno 5,5% za hrvatske izolate i 60% za belgijske izolate. Stope rasta izolata drastično su se povećale za izolate na 30/20 °C u odnosu na izolate koji su rasli na 20 °C, i iznosile su od 1,06 – 9,14 puta više nego kod 20 °C u istom periodu motrenja. Kod drugih istraživanja (Kowalski & Bartnik 2010) samo je 10% izolata zadržalo sposobnost rasta na temperaturi od 30 °C. Granične temperature vrijednosti, tj. minimum optimum i maksimum, se upotrebljavaju za klasiranje gljiva kao psikrofilne (preferiraju hladno), mezofilne i termofilne (Griffin 1981). Kako *C. fraxinea* preferira umjerene temperature može se je klasificirati kao mezofilnu vrstu (Kowalski & Bartnik 2010), međutim budući da može rasti i na niskim temperaturama (5 °C) može se klasificirati kao psikrotolerantni organizam (Deacon 2006).

Kod hrvatskih izolata temperature za sterilizaciju gljive bi trebale biti više. Usporedbom s drugim istraživanjima 36 °C pri trajanju od 5 – 10 h trebalo bi biti dovoljno za sterilizaciju micelija unutar sadnica (Hauptman et al. 2013). Belgijski izolati pokazali su se osjetljiviji na više temperature od hrvatskih izolata što ukazuje da treba provesti dodatna istraživanja koja bi potvrdila temperature granične vrijednosti za sterilizaciju hrvatskih izolata. Razlozi

osjetljivosti belgijskih izolata na više temperature mogli bi biti povezani s hladnijim okolišnim uvjetima u Belgiji što u konačnici rezultira uniformnijom prilagodbom patogena na hladnije uvjete, dok u Hrvatskoj značajne razlike između hladnijih i toplijih (nizinskih) područja rezultira većom diverzifikacijom izolata u prilagodbi na okolišne ekstremne uvjete. Pojačan rast preživjelih izolata nakon izlaganja temperaturnom ekstremu visoke temperature mogao bi biti pokazatelj prilagodbe patogena na klimatske uvjete ekstremnijih podneblja. Brza reaktivacija i povećane stope rasta nakon izlaganja visokim temperaturama mogu biti razlog opstanka patogena u nizinskim područjima Hrvatske. O sličnim prilagodbama patogena na klimatske uvjete kao i moguću genetsku varijaciju izolata patogena *H. fraxineus* uslijed ekstremnih klimatskih uvjeta opisali su u istraživanju (Kraj & Kowalski 2014).

Utvrđene su značajne razlike u stopi rasta izolata između pojedinih lokacija pri različitim temperaturama. Ovi rezultati pokazuju varijabilnost između izolata *C. fraxinea*. Morfološka varijabilnost izolata također je utvrđena istraživanjem (Kowalski & Bartnik 2010), kao i varijabilnost u patogenosti (Bakys et al. 2009) i nekim genetskim markerima (Rytönen et al. 2011; Bengtsson et al. 2012; Kraj et al. 2012). Međutim varijabilnost između izolata pri optimalnoj temperaturi u našem istraživanju je manja nego što je bila u istraživanju (Kowalski & Bartnik 2010). Razlog tome je mali broj testiranih izolata. Također, rast nekih poljskih izolata pri temperaturi od 30 °C ukazuje da naša selekcija izolata nije uključivala izolate koji su tolerantni na više temperature.

Rezultati su pokazali da određeni izolati nemaju mogućnost rasta pri temperaturi od 10 °C i niže, a ti izolati su Čazma K3, Čazma K23, Brinje L2, Ivanščica L3, Ivanščica L5, Delnice L3.1, te belgijski izolati Soulmes 1I, Soulmes 2I, Soulmes 1II, Chevetogne A i Rulles 2IIpet. Zanimljivo je kako su neki od tih izolata upravo iz područja koji dobar dio godine imaju temperature zraka niže od 10 °C. Također nije utvrđena povezanost smanjenog rasta izolata s prisutnošću virusa HfMV1 u pojedinim izolatima, niti s tipom idiomorfa izolata.

#### **4.2.3. Molekularne analize izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus***

Protokol za detekciju i identifikaciju gljive *H. fraxineus* u tkivima jasena razvijen je zbog potrebe brze i sigurne detekcije gljive *H. fraxineus* kao uzročnika sušenja jasena. Budući da sušenje jasena ponekad može biti povezano s drugim gljivičnim uzročnicima, pouzdana identifikacija uzročnika je preduvjet za predlaganje kontrolnih mjera. Prilikom razvijanja ove metode i testiranja specifičnosti i osjetljivosti testa, PCR testovi su rađeni na izoliranoj DNA



drugih vrsta gljiva s oštećenih stabala jasena. Većina identificiranih vrsta gljiva su već spomenute u drugim istraživanjima (Bakys, Vasaitis, Barklund, Thomsen, et al. 2009; Przybył 2002). Niti jedna od tih gljiva nije identificirana s selektiranim početnicama i sondom. Štoviše, kako seksualni stadij *C. fraxinea* pripada rodu *Hymenoscyphus* (Kowalski & Holdenrieder 2009b) mnogostruki poredak sekvenci je napravljen s nekoliko *Hymenoscyphus* vrsta. Među tim vrstama koje su uzimane u obzir, *H. caudatus*, saprofitska vrsta na trulim listopadnim stablima, pokazivala je visoku homologiju sekvenci s *C. fraxinea*. Baze početnice i proba su zato selektirani u regiji koja je polimorfična između obje vrste. Nadalje utvrđeno je da metode sakupljanja uzoraka ne utječu na osjetljivost kod ovog testiranja qPCR-om. Nakon ekstrakcije DNA sukladno protokolu (Slika 80), DNA ekstrakti su kvantificirani na spektrofotometru i razrijeđeni na vrijednosti od 1 ng/μl za daljnju upotrebu (Tablica 49). Protokol za upotrebu qPCR-a u dokazivanju identiteta patogena *H. fraxineus*, razrađen u CRAW istraživačkom centru (Chandelier et al. 2010) (Slika 81), upotrebljen je za određivanje identiteta patogena, za kvantifikaciju ekstrahirane DNA (bazirano na Ct vrijednostima praga), te za potvrđivanje prisutnosti DNA kontaminacije prilikom DNA ekstrakcijskog postupka (Slika 80). Potvrđen je identitet svih 33 izolata kao gljivični patogen *H. fraxineus* gdje su vrijednosti amplificirane ITS regije genoma rDNA specifične za tu vrstu amplificirane iznad Ct vrijednosti praga (Tablica 49). Baze početnice amplificirale su 81 bp fragment DNA koji je specifičan samo za vrstu *H. fraxineus*, ne i za druge vrste roda *Hymenoscyphus* ili *Chalara* ili druge vrste gljiva povezanih s jasenom. Potvrđeni identitet svih 33 izolata govori nam u prilog da su metode izolacije *H. fraxineus* iz biljnih tkiva jasena, koje smo koristili prema već opisanom postupku izolacije, te za dobivanje čistih kultura gljive, usavršene metode.

Prema istraživanju (Gross et al. 2012) *H. fraxineus* pokazuje heterotalični sustav reprodukcije za razliku od *H. albidus* čiji sustav je strukturalno homotaličan. Heterotalične vrste u redu Helotiales sadržavaju gene MAT1-1-1 i MAT1-1-3 u MAT1-1 idimorfu koji kodira proteine koji sadržavaju  $\alpha$ -domenu-vezujući-motiv i MATA\_HMG-box motiv (Foster et al. 2003; Singh et al. 1999; Zaffarano et al. 2010). MAT1-2 idimorf sadrži gen MAT1-2-1 uključujući i MATA\_HMG-box domenu (Amselem et al. 2011; Zaffarano et al. 2010). Kod homotaličnih vrsta MAT geni su uobičajeno udruženi unutar iste genomske regije jedne jedinice. Konzervirani geni SLA2 i APN2 su uobičajeno bočno situirani u MAT lokusu kod askomiceta (Debuchy & Turgeon 2006), te su također prisutni u bočnim regijama MAT lokusa kod vrsta reda Helotiales (Amselem et al. 2011; Zaffarano et al. 2010). Ta MAT konfiguracija je također pronađena na MAT lokusu heterotalične vrste *H. fraxineus* i

homotalične vrste *H. albidus* osim što očekivani MAT1-1-1 gen nije mogao biti amplificiran kod niti jedne od ove dvije vrste. Ostaje nepoznanica dali gen MAT1-1-1 uopće postoji kod *H. fraxineus* i *H. albidus* (Gross et al. 2012). U istom istraživanju križanja s dva soja MAT1-1 x MAT1-2 rezultiralo je produkcijom nedozrelih apotecija kod polovice uzoraka. Inkubacijski period pri niskim temperaturama (4 °C) očigledno nije bio krucijalan jer su se apoteciji razvijali na obje temperature (4 i 20 °C). Ne-alelna vegetativna inkompatibilnost može spriječiti fertilizaciju, te može to biti razlog poremećaja formacije apotecija (Glass et al. 2000). Demarkacijske zone između pojedinih kultura izolata primijećene su *in vitro*, te su evidentne na peteljka između susjednih genotipova, što potvrđuje prisutnost sistema vegetativne kompatibilnosti kod vrste *H. fraxineus*. Sojevi izolirani iz nekrotičnih lezija moraju biti jako virulentni, dok sojevi izolirani iz lisnih peteljki mogu i ne moraju biti virulentni (Gross et al. 2012). Nejednaka MAT distribucija kod izolata može biti povezana s virulentnošću izolata kao što je to primijećeno kod nekih drugih gljivičnih patogena (Lee et al. 1999; Zhan et al. 2007). MAT omjeri nisu iskrivljeni niti su značajno odstupali od omjera 1:1, bez obzira dali su izolati potjecali iz peteljke ili iz drvnog tkiva (Gross et al. 2012). Međutim u našem istraživanju omjeri MAT1 i MAT 2 nisu podržavali omjer 1:1 već su značajno odstupali od toga što je u skladu s drugim istraživanjem gdje su MAT omjeri bili 3:1 (Gross et al. 2012). Omjeri mogu značajno odstupati od 1:1 omjera pogotovo u kulturama iz mono-askospora, dok bi u prirodnim populacijama omjeri trebali biti bliži 1:1. Razlog zašto je to tako zahtjeva dodatna istraživanja iako je moguće da kulture iz mono-askospora mogu biti pristrane jer nema slučajnog uzorkovanja. Omjeri kod hrvatskih izolata bili su 2:1, a kod belgijskih izolata 6:1. MAT omjer pokazao je utjecaj vezan za geografsko porijeklo, dok kod drugih istraživanja nije (Gross et al. 2012). Tipovi idiomorfa imaju krucijalnu ulogu u širenju i fruktifikaciji gljive *H. fraxineus*. Na jednom otpalom rahisu pronađeno je i do 8 različitih genotipova. Broj genotipova ovisi o količini spora odnosno inokuluma u zraku. Rezultati istraživanja (Gross et al. 2012) potvrđuju da majčin soj ne mora nužno biti na istom rahisu kao i očinski soj, već postoji indirektna indikacija da se fertilizacija može uspostaviti kroz fuziju spermacija (konidiospora) s askogonijem. Također voda može služiti kao medij transporta konidija. Budući da konidije nisu infektivne, te nisu primijećene nikakve klonske populacije, konidije najvjerojatnije djeluju isključivo kao spermacije (Bengtsson et al. 2012; Gross et al. 2012; Kraj et al. 2012).

Mikovirusi su učestalo nađeni u svim glavnim grupama biljnih patogenih gljiva. Neki od tih virusa mogu uzrokovati bolesti koje uzrokuju slabljenje organizma ili reducirati virulentnost

kod svojih gljivičnih domaćina, te stoga mogu poslužiti kao agenti biološke kontrole (npr. hipovirusi u gljivi *Cryphonectria parasitica*). Glavni cilj provedenog istraživanja bio je pokušati identificirati mikovirus u patogenu uzročniku sušenja jasena u Hrvatskoj. Metode identifikacije mikovirusa su preuzete i rađene u skladu s istraživanjem (Schoebel et al. 2014). Testirano je svih 33 izolata (18 hrvatskih i 15 belgijskih) na prisutnost *Hymenoscyphus fraxineus* Mitovirus 1 (HfMV1 virusa). Novi mitovirus je vrlo varijabilan između različitih Europskih izolata, te se ubrzano razvija i širi varijabilnost, što je vrlo obećavajuće za buduću potragu za sojem adekvatnim za upotrebu u biološkoj kontroli. Da bi se utvrdila rasprostranjenost odnosno prisutnost virusa u izolatima, Upotrebljavali smo protokole (Slika 84; Slika 85; Slika 86) utvrđene istraživanjem (Schoebel et al. 2014). Upotrijebili smo početnice Cf4\_F1 i Cf4\_R3 prema protokolu te promatrali dobivene vrijednosti amplifikacije. Za izradu procjene prisutnosti RNA za amplifikaciju, u ovoj kontrolnoj PCR amplifikaciji jedan od aktin-specifičnih početnica prelazi preko intron–exon granice što omogućuje specifičnu amplifikaciju aktin cDNA (izvedenu iz aktin mRNA) od *H. fraxineus* (Tablica 4). Uzorak se smatrao mitovirus pozitivnim ako je producirao i virus-specifične (511 bp) i aktin-specifične PCR produkte (300 bp), te mitovirus negativan ako je producirao samo aktin-specifične PCR produkte (300 bp). Sukladno dobivenim rezultatima mitovirus HfMV1 pozitivno bilo je 27,7% hrvatskih i 66,7% belgijskih izolata. Mitovirusi su najmanji od svih RNA virusa (veličina genoma 2-3 kb), dok njihov genom kodira samo jedan protein. Štoviše, svi mitovirusi su nađeni ekskluzivno unutar mitohondrija njihovih domaćina i iskorištavaju mitohondrijski translacijski kodon (Esteban & Fujimura 2008; Hillman & Cai 2013). Novi mitovirus HfMV1 je najbliže srodan *Cryphonectria cubensis* mitovirus 1a, 1b, 1c, *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus 2, te *Helicobasidium mompa* mitovirus 1–18, to su tri mitovirusa detektirana u drugim biljnim patogenim gljivama (Schoebel et al. 2014). Učestalost HfMV1 u švicarskim populacijama bio je i do 90% (Schoebel et al. 2014), ovako česta pojava prisutnosti mitovirusa nađena je i kod drugih biljnih patogenih gljiva. Kod *G. abietina* mitovirus je nađen u 74% izolata (Botella et al. 2012), a kod *Botrytis cinerea* i do 81% (prosječno 55%) u Španjolskoj (Rodriguez-Garcia et al. 2014), te čak do 90% (prosječno 72%) na Novom Zelandu (Howitt et al. 1995). Učestalost HfMV1 kod belgijskih izolata u ovom istraživanju (66,7%) odgovara visokoj učestalosti mitovirusa u drugim istraživanjima, dok kod hrvatskih izolata učestalost od samo 27,7% mogla bi predstavljati razlog povećane virulentnosti hrvatskih izolata, te njihovom bržem rastu pri optimalnim temperaturama. Hipotetsku povećanu virulentnost hrvatskih izolata treba dokazati u daljnjim istraživanjima

kroz testove patogenosti. Za aseksualno prenosiv CHV-1 virus u rodu *Hypovirus*, prosječna učestalost od 53% (rang 20-85%) je pronađena u osam europskih populacija *C. parasitica* (Bryner & Rigling 2012). Najuvjerljivije objašnjenje za HfMV1 da je toliko učestao je to da se vertikalno prenosi u seksualne spore (askospore), preko kojih se *H. fraxineus* širi i nove infekcije započinju na stablima jasena (Gross et al. 2014a). Transmisija mitovirusa u seksualne spore je ranije zabilježena za *C. parasitica* mitovirus NB631 (Polashock et al. 1997). Visoka mitovirusna rasprostranjenost u uzorkovanim populacijama i vrstama izoliranih tkiva (npr. rahisi naspram lezije), ukazuje na to da se virus raširio efikasno s gljivom, te da je održavan tijekom gljivičnog biološkog životnog ciklusa (Schoebel et al. 2014). Statistički signifikantna razlika u rasprostranjenosti HfMV1 između populacija dokazuje da se virus u Hrvatskoj nije dobro etablirao stoga je moguće da su zbog ekstremnih uvjeta graničnih područja rasprostranjenosti gljive opstali virulentniji izolati bez virusa. Zbog visoke rasprostranjenosti detektiranog mitovirusa, generalni štetan učinak na gljivu domaćina nije vrlo vjerojatan. Međutim, za druge biljne patogene gljive uključujući i *S. homoeocarpa* (Deng et al. 2003; Zhou & Boland 1997) i *O. novo-ulmi* (Hong et al. 1999a), istraživanja su pokazala da mikovirusi koji spadaju u isti rod (*Mitovirus*) uzrokuju hipovirulentnost kod svojih domaćina. Treba uzeti u obzir i rapidne genetske promjene u genomu HfMV1, što je vrlo obećavajuće jer povećava vjerojatnost pojave i identifikacije soja virusa koji može imati sposobnost induciranja štetnosti ili reducirati virulentnost kod gljive domaćina i kao takav biti pogodan za biološku kontrolu patogena *H. fraxineus*.

Kod nekih istraživanja aplicirani molekularni markeri ukazuju na visoku genetsku varijabilnost, te interregionalnu genetsku strukturu gljivičnih populacija *C. fraxinea* koje ovise o geografskoj lokaciji i klimatskim uvjetima (Kraj et al. 2012). RAMS markeri se često upotrebljavaju za karakterizaciju genetske varijabilnosti jer su krajnje polimorfni, te je za analizu potrebna vrlo mala količina micelija (Grünig et al. 2001; Kraj & Kowalski 2008; McDonald & Linde 2002). Genetska varijabilnost gljive *C. fraxinea* determinirana je višestrukim lokusima na genomu. U ovom istraživanju nisu pronađene individue s identičnim haplotipovima. To upućuje na zaključak da jedina metoda propagacije kod gljive *H. fraxineus* je formiranje askospora, što je zaključio i (Kraj et al. 2012) u svom istraživanju. Slično je primijetio (Kirisits et al. 2009) koji je utvrdio da konidije ne germiniraju na MEA mediumu, V8 agaru, niti na agar mediumu s dodatkom ekstrakta lista jasena koji je dokazano stimulirao rast micelija. Također, (Rytkönen et al. 2011) je primijetio veliki udio haplotipova (14 u 32 izolata), te visoku genetsku varijabilnost gljive.

Visoka genetska varijabilnost gljive *H. fraxineus* utvrđena je i u našem istraživanju. Konstrukcijom filogenetskog stabla kao i AMOVA analizom utvrđeno je postojanje dvaju populacija koje se dalje mogu razgranati na čak sedam subpopulacijskih grupa izolata. Dobivene populacije ne korespondiraju s geografskim podrijetlom izolata (Hrvatska, Belgija).

Između najvažnijih izvora genetske varijabilnosti kod gljiva su selekcija različitih alela i genotipova, ovisno o lokalnom okolišu, limitacije genetskog toka i efekta osnivača, te epidemijskog širenja na nove biljne populacije domaćina (Hedrick 2000; Wang 1997). Sve mjere intrapopulacijske varijabilnosti primijenjene u istraživanju ukazale su da je genetska varijabilnost pozitivno korelirana s nadmorskom visinom (Kraj et al. 2012). Isto istraživanje potvrdilo je da usporedbom intrapopulacijske genetske varijabilnosti između izolata iz nizinskih i izolata iz viših područja postoje značajne razlike. Naše istraživanje nije potvrdilo pozitivnu koreliranost genetske varijabilnosti izolata s nadmorskom visinom, ali razlog tome može biti mali broj uzoraka, te relativno malo broj signala fragmenata DNA (17) koji su se jasno vizualno diferencirali nakon elektroforeze na svim izolatima. Sukladno našem istraživanju, genetska varijabilnost *H. fraxineus* izolata nije povezana s geografskom udaljenošću regija, kao što je to potvrđeno kod nekih drugih vrsta gljiva. Kao primjer, glavni faktori koji utječu na genetsku varijabilnost gljive *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet su klimatski uvjeti i debljina snježnog pokrivača (Kraj & Kowalski 2008; Uotila et al. 2006). Viša stopa genetske varijabilnosti izolata na višim nadmorskim visinama su povezane s oštrijom i varijabilnijom klimom. Sojevi *Sclerophoma pythiophila* (Corda) v. Hoehn koji potječu iz različitih regija, također su ukazivali visoku razinu intrapopulacijske varijabilnosti, ovisno o klimatskim uvjetima (Kraj 2009). Za gljivu *C. fraxinea* u Poljskoj, efekt klimatskih uvjeta na nivou intrapopulacijskog varijabiliteta je potvrđen s AMOVA analizom koja je ukazala na veću (13%) varijabilnost između izolata koji potječu iz nizina i viših područja u usporedbi sa samo (2%) udjela varijabiliteta između geografski udaljenih regija. To znači da 87% razlika se mogu objasniti nadmorskom visinom (Kraj et al. 2012). Pretpostavka je da visoka genetska varijabilnost izolata *H. fraxineus* je povezana s potrebom adaptacije na klimatske uvjete. Razvoj i širenje gljivičnih patogena ovise snažno o vlazi i temperaturi, te mogućnost nošenja s tim faktorom je esencijalna za preživljavanje (Huber & Gillespie 1992). Visoka genetska varijabilnost *H. fraxineus* populacija, koja je evoluirala kao odgovor na klimatske uvjete, može također doprinijeti virulentnosti patogena (Kraj et al. 2012). Zbog svega navedenog potrebno je izvršiti daljnja istraživanja da bi se obuhvatila veća skupina uzoraka da bi se moglo utvrditi postojanje korelacije s klimatskim faktorima i/ili

virulentnošću patogena. Izolati *H. fraxineus*, ovisno o temperaturi ukazuju značajne razlike u stopi rasta *in vitro* (Kowalski & Bartnik 2010). Takve razlike u rastu nisu nastale samo između izolata jako udaljenog podrijetla, već također između izolata koji potječu iz istih šumskih gospodarskih jedinica što je potvrđeno našim istraživanjima. Inokulacijski eksperimenti pokazuju toleranciju individualnih stabala jasena na patogena *H. fraxineus* kako u plasteniku (Bakys et al. 2009) tako i na terenu (Stener 2013). Visoka stopa genetske varijacije je karakteristična za organizme s seksualnom reprodukcijom i širokom geografskom distribucijom (James et al. 1999; Hedrick 2000), dok suprotno vrijedi za vrste s restriktivnom distribucijom, manjim populacijama ili kod organizama koji se reproduciraju aseksualno (Burdon & Roelfs 1985). Visoka genetska varijabilnost je donekle neočekivana za patogena koji je najvjerojatnije introducirani u Europu (Queloz et al. 2011a).

#### **4.2.4. Istraživanje rasta izolata patogena na hranjivoj podlozi uz dodatak ekstrakta lišća *Fraxinus* spp.**

Istraživanje provedeno na tri tipa agar medija s dodatkom ekstrakta lišća autohtonih vrsta jasena u Hrvatskoj otkrilo je najbrži rast izolata *H. fraxineus* na agaru obogaćenom ekstraktima lišća običnog jasena, zatim agaru s ekstraktom lišća crnog jasena, te najsporiji rast izolata utvrđen je na agaru s ekstraktima lišća poljskog jasena. Najbrži rast izolata se može parcijalno objasniti s činjenicom da oba izolata potječu iz drvnog tkiva *F. excelsior*, te da su izolati bili dobro prilagođeni na ekstrakte osobito ovog domaćina. To se poklapa s rezultatima istraživanja *in vitro* koja su objavili (Carrari et al. 2015), osim visoke varijabilnosti kod agara s ekstraktom lišća *F. angustifolia* koja se može objasniti kroz veću genotipsku varijabilnost u uzorku lišća upotrebljenom za dobivanje mediuma s ekstraktom, gdje je korišten sakupljeni uzorak smjese pet različitih sadnica poljskog jasena. Drugo objašnjenje može biti da otkrivena varijabilnost u stopi rasta kod mediuma s ekstraktom poljskog jasena se može povezati s dobivenim intra-klonskim varijabilnostima kod klonova poljskog jasena u istraživanju osjetljivosti klonova s istim izolatima patogena. Dodatna istraživanja se moraju provesti da bi se utvrdilo koje od ova dva objašnjenja je ispravno, dali je visoka varijabilnost rezultat različitih genotipova upotrijebljenih u pokusu ili rezultat intra-klonske varijabilnosti vrste *F. angustifolia* bazirane na jednom genotipu. Stope rasta na različitim medijima koreliraju s osjetljivošću vrsta domaćina. Sukladno istraživanju (Carrari et al. 2015) stope rasta na mediumu koji sadržava ekstrakte lišća osjetljivih domaćina su više nego na mediumu koji sadržava ekstrakte lišća rezistentnih domaćina. Ovaj rezultat može

poslužiti kao baza za daljnja istraživanja na izolatima čije porijeklo je iz različitih vrsta domaćina i različitog tkiva domaćina, upotpunjujući znanje o biologiji novog patogena roda *Fraxinus*.

#### **4.2.5. Istraživanje djelovanja različitih valnih duljina UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus***

##### **Utjecaj UV svjetlosti na rast izolata gljive**

Svjetlost u prirodi predstavlja važan čimbenik kao nositelj informacija. Molekularni sustavi prevodeći svjetlosnu elektromagnetsku energiju (fotone) u kemijski jezik stanica odašilju vitalni signal za prilagodbu virtualno svakog živog organizma na njegovo stanište (Tisch & Schmoll 2010; Rodriguez-Romero et al. 2010). Istraživanja su pokazala da gljive na svjetlost reagiraju na različite načine, te iniciraju značajne adaptacije u svojim metaboličkim putevima na rast u svjetlu ili nakon percepcije svjetlosnog pulsa (Tisch & Schmoll 2010). Isto istraživanje je pokazalo da alteracije kao odgovor na svjetlosni signal se prvenstveno opažaju u karotenoidnom metabolizmu, polisaharidnom i karbohidratnom metabolizmu, metabolizmu masnih kiselina, nukleotidnom i nukleosidnom metabolizmu, te njihovoj regulaciji u produkciji sekundarnih metabolita. Transkripcija gena započinje samo nekoliko minuta nakon izlaganje svjetlosti, prilagođava se ogroman nalet i aktivnost metaboličkih enzima, te naposljetku nivoi metabolita se mijenjaju da bi se nosili s štetnim čimbenicima svjetlosti, ili da se pripreme na reprodukciju, koja je zavisna o svjetlosti na mnogo načina. Mnoga istraživanja govore o fungicidnim ili fungistatičnim efektima ultravioletne svjetlosti (Özçelik 2007; Inglis et al. 1995; Idnurm & Heitman 2005; Nakamura et al. 2002; Valero et al. 2007). Brojna istraživanja istražuju UV svjetlost kao način kontrole gljive, i njezine fruktifikacije (Valero et al. 2007; Nakamura et al. 2002; Inglis et al. 1995). Adaptaciju patogenih gljiva na stres izazvan izlaganjem različitim stresnim čimbenicima uključujući i izlaganje svjetlosnim uvjetima obrazloženo je istraživanjem (Brown et al. 2014). Osjetilo za svjetlost je kod biljaka od ključne važnosti da bi mogle optimizirati svjetlosno-ovisnu konzervaciju energije, a kod nefotosintetskih organizama važna funkcija je sinkronizacija biološkog sata na duljinu dana (Rodriguez-Romero et al. 2010). Filamentozne gljive upotrebljavaju svjetlosni signal kao indikator izloženosti hifa na zrak te prilagođavaju svoju fiziologiju na tu situaciju ili induciraju morfogenetičke puteve (Rodriguez-Romero et al. 2010). Istraživanje na blue/UV svjetlosti utvrđuje specifične gene kod gljiva koji reguliraju i kontroliraju metabolizam gljive i njezinu prilagodbu na djelovanje svjetlosti na način da brisanjem BWC1 i BWC2 gena reducira rast i virulentnost patogene gljive *Cryptococcus neoformans* (Idnurm & Heitman

2005). Isto istraživanje dokazuje da uloga blue/UV svjetlosti u kontrolnom razvoju je prastari proces koji je stariji čak i od razdvajanja gljiva u red Ascomycetes i Basidiomycetes.

Zbog učinka uništavanja i različitih učinkovitosti preparata za dezinfekciju, UV svjetlost je preferirana metoda sterilizacije u različitim poljima pogotovo u laboratorijima, dentalnoj medicini i kozmetici. Vrijeme i svojstva površine su najvažnije stvari kod UV sterilizacije. Osim toga, valna duljina UV svjetlosti, te udaljenost između lampe i objekta sterilizacije su asocirani s fungistatskim i fungicidnim efektom UV svjetlosti. Efikasnost procesa dezinfekcije je uobičajeno mjereno i opisan ovisno o stupnju propadanja mikroorganizama (Favier et al. 2001; Wallbank et al. 1985; Bourrouet et al. 2001; Ishida et al. 1991; Schoenen & Kolch 1992). Istraživanja govore da ovisno o uvjetima površine i vremenu izlaganja mikroorganizama UV svjetlosti ovisi uspješnost sterilizacije, tako je UV svjetlost (254 – 354 nm) u vremenskom periodu od 45 min dovoljna za sterilizaciju laboratorijskih alata od kvasaca, bakterija i gljiva, dok kod plijesni je potrebno i do 75 min osim kod površina s mediumom (Özçelik 2007). Postoji nekoliko problema kod metoda sterilizacije vode posebice u određivanju pravilne UV doze (Qualls & Johnson 1983). U istraživanju efikasnosti UV svjetlosti u redukciji *E. coli* u jabukovači, rezultati su pokazali da pozadinska mikrobna populacija u tekućinama, zajedno s česticama i organskom materijom, je povezana s slabim prijenosom UV svjetlosti (Wright et al. 2000). U ovom istraživanju upotrebljavana je želatinosna smjesa MEA agar mediuma na kojoj su rasle kulture gljiva, površinski su direktno bile izložene djelovanju svjetlosti, međutim upitna je provodljivost UV svjetlosti kroz želatinozni agar, kao i moguća redukcija provodljivosti UV svjetlosti zbog čestica u smjesi. Kod gljiva baktericidni i bakterostatski efekt je procjenjivan nakon primjene UV svjetlosti različitih valnih duljina u istom vremenskom intervalu od 12:12 (12 h mrak : 12 h UV radijacija). (Bourrouet et al. 2001) je u svom istraživanju naveo da efikasnost dezinfekcije UV svjetlom ovisi o dozi UV svjetlosti i mikrobnoj koncentraciji. Stoga svojstva kontaminiranih površina kao što su gruboća, reflektivnost ili glatkoća može igrati važnu ulogu u efektu sterilizacije. Inaktivacija mikroorganizama ovisi o valnim duljinama i intenzitetu induciranog svjetla kao i drugim fizičkim i kemijskim parametrima kao što su temperatura i uvjeti dostupnosti hranjiva za bakterije i gljive (Schoenen & Kolch 1992). U ovom istraživanju testirani izolati gljive *H. fraxineus* pokazali su različite učinke UV svjetlosti na rast i fruktifikaciju gljive ovisno o apliciranim valnim duljinama svjetlosti. Sukladno makroskopskom pregledu izolata izvršenom nakon tretiranja s UV svjetlosti, utvrđeno je da različiti spektri UV svjetlosti imaju biostatički efekt na patogene, ali ne i biocidni. Biocidni



efekt je utvrđen samo na jednom izolatu (Nafruiture P) pri tretiranju s UVA svjetlošću (315 – 400 nm). Fungistatični efekt je jači pri nižim valnim duljinama UVB (280 – 315 nm) i UVA (315 – 400 nm) svjetlu, dok je manje djelotvoran u VS (vidljivom djelu spektra svjetlosti 390 – 750 nm). Iznimke su se ukazale kod izolata Zalesina L3.2 gdje UVA svjetlost ne pokazuje fungistatsku sposobnost na rast gljive, te kod belgijskih izolata gdje Soulmes 1II pokazuje intenzivniji rast djelovanjem UVB i UVA svjetlosti, zatim Gembloux/II i Chevetogne 4II koji pokazuju intenzivniji rast samo kod VS djelovanja.

Kod utjecaja različitih duljina UV svjetlosti na fruktifikaciju gljive *H. fraxineus* ponovno su pretežno manje valne duljine (UVB i UVA) svjetlosti pokazale inhibicijski efekt odnosno značajnu redukciju produkcije spora u odnosu na kontrolni uzorak. Odstupanja postoje kod izolata Nova gradiška K1 gdje UVA svjetlost nije reducirala sporulaciju, te kod izolata Brinje L3 gdje je djelovanje UVA svjetlosti rezultiralo intenziviranjem sporulacije. Vidljivi dio spektra (VS) svjetlosti kod svih je izolata osim izolata Soulmes 1II intenzivirao proces sporulacije. Djelovanje UVB i UVA spektra svjetlosti je dovoljno agresivno da reducira rast i sporulaciju gljive međutim ne i da ju ubije (bar ne na agar mediumu) sterilizacijom, stres i utjecaj na gljivu putem agresivnog djelovanja UV svjetlosti nižih valnih duljina dovoljan je da naruši normalne metaboličke funkcije gljive, dok kod viših valnih duljina nedovoljna agresivnost UV svjetlosti, odnosno adaptibilnost patogena na više valne duljine, uzrokuje pojačanu produkciju razmnožavanja gljive i borbe za opstanak. Iako VS svjetlosti ima potencijal da djelomično inhibira rast gljive, to se pokazalo nedovoljnim gdje u konačnici izaziva reakciju gljive koja pojačanom sporulacijom i borbom za opstanak izaziva suprotni efekt. To može objasniti i pojačanu produkciju konidija na biljnom lisnom supstratu u šumi, te intenzivno širenje gljive gdje dodir s vidljivim spektrom svjetlosti djeluje kao okidač na koji gljiva reagira abnormalnom sporulacijom konidija koje djeluju kao spermacije i uzrokuju u konačnici pojačanu produkciju apotecija i novih infekcija. Budući da niže valne duljine svjetlosti (UVB i UVA) polučuju bolje rezultate kao fungistatici, potrebna su daljnja testiranja s UVC (100 - 280 nm) zrakama svjetlosti koje bi mogle polučiti biocidni sterilizirajući efekt i u vjerojatno kraćem vremenskom razdoblju izlaganja.

Utjecaj UVB svjetlosti je jače utjecao na pojedine Belgijske izolate, a slabije na Hrvatske, dok je utjecaj UVA svjetlosti bio podjednak na Belgijske i Hrvatske izolate. Vidljivi spektar svjetlosti nemože signifikantno reducirati rast gljive, vjerojatno stoga što je izlaganjem ovom spektru gljiva stvorila tolerantnost na frekvencije ovih valnih duljina. Redukcija fruktifikacije izolata smanjuje se s povećavanjem valnih duljina UV svjetlosti, logično je zaključiti da su se

izolati evolucijski bolje prilagodili na valne duljine vidljivog spektra, te da fotoreceptori na valne duljine VS reagiraju slanjem signala za hiperprodukciju spora zbog detekcije opasnosti od istrebljenja vrste.

#### **4.2.6. Istraživanje djelovanja Allicina na rast i fruktifikaciju izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus***

Svaki je ekosustav jedinstven po svom staništu, ali i po biljnim i životinjskim vrstama unutar njega. Svaka skupina organizama iste vrste ima određene specifične zahtjeve unutar tog ekosustava stoga je logično da i mjere zaštite od određenih organizama moraju biti prilagođene svakom organizmu na nivou vrste ili roda zasebno. Integrirana zaštita šuma obuhvaća taj princip racionalne primjene i kombinacije različitih mjera zaštite, dajući prednost biološkim, mehaničkim i biotehničkim metodama, dok se kemijske metode koriste restriktivno. Zaštita šuma na području cijele Hrvatske i Europske unije sve se više temelji na principima integrirane zaštite šuma, te načelima certificiranja i poštivanja standarda potrajnog gospodarenja šumskim ekosustavima (FSC Forest Management Certification Standard). Sukladno tome biološka sredstva za zaštitu bilja dolaze sve više do izražaja, te se kontinuirano traže supstance ili metode najkvalitenije primjene zaštite bez negativnih posljedica za ekosustav i druge organizme koji u njemu obitavaju. Danas se sva biološka i biotehnička sredstva za zaštitu predstavljaju kao alternativa sintetičkim i kemijskim sredstvima, kako prema načinu primjene (B.I.T.E. Blade for Infusion in Trees), tako i prema samom sastavu i porijeklu djelatnih tvari u pripravcima.

Zbog sve strožih regulatornih zakonodavnih mjera u upotrebi fungicidnih pripravaka, te sve veće pojave rezistentnosti patogena na različite skupine fungicida, potrebno je istražiti mogućnosti primjene alternativnih organskih i anorganskih supstanci koje nemaju izraženi negativni učinak na okoliš, ne predstavljaju velike opasnosti trovanja pri primjeni, te ne izazivaju pojavu rezistentnosti i prilagodbu mikroorganizama na mehanizme djelovanja tih sredstava. Odbor za fungicidnu rezistentnost (Fungicide Resistance Action Committee FRAC), danas povezan s CropLife International, dao je 1994. godine široki pregled napretka diljem svijeta u pogledu rezitentnosti fungicida, te velikih problema koje je potrebno riješiti (Brent & Hollomon 2007). Uzimajući u obzir trenutno zakonodavstvo po pitanju upotrebe fungicida (*i.e.* Directive 2009/128/EC na Europskom nivou; European commission 2009), trebalo bi razmatrati okolišno sigurnije alternative tradicionalnom pristupu apliciranja (špricanja) kemikalija. U posljednje vrijeme postoji povećana zainteresiranost za biološku kontrolu gljivičnih patogena i bolesti koje prouzrokuju (Santamaria et al. 2007). Neki od

autora navode upotrebu prirodnih fungicidnih pripravaka kao što je Fungastop™ za zaštitu od gljivičnih patogena iz rodova *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* i *Sclerotinia*, te bakterija iz rodova *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas* (Martínez-Romero et al. 2008). Endoterapeutski tretmani, dostavljajući supstance direktno u drveno tkivo, su sve više široko prihvaćeni kako ljudi bivaju sve više zabrinuti zbog negativnih posljedica pesticida na ljude i generalno na okoliš (Pavela & Barnett 2005; Ferracini & Alma 2008; Tanis et al. 2012). Zbog tih zabrinutosti, te zbog biologije bolesti koju uzrokuje gljiva *H. fraxineus*, selektirani spojevi su upotrijebljeni za endoksilematsko injektiranje u tkiva jasenovih stabala protiv patogena *H. fraxineus* u istraživanju (Dal Maso et al. 2014). Funkcionalnost alata upotrebljenih za endoksilematsko tretiranje (B.I.T.E. tool) isključivo ovisi o fiziološkom stanju stabla (Montecchio 2013). Uspješno injektiranje u drveno tkivo na stablima vrsta iz roda *Fraxinus* prema različitim autorima može ovisiti o različitim metodama aplikacije, vrsti drveća i klimatskim uvjetima (Docola et al. 2011; Smitley et al. 2010). Sukladno istraživanju (Dal Maso et al. 2014) tri mjeseca nakon injektiranja niti thiabendazol niti Allicin nisu u potpunosti zaustavili progresiju bolesti tijekom vegetacijskog razdoblja. To može ovisiti, kao i kod drugih biljnih bolesti (Perry et al. 1991; Downer et al. 2009; Ivić 2010; Koch et al. 2010) o koncentraciji produkata, formulaciji ili distribuciji unutar stabla (Tanis et al. 2012; Aćimović et al. 2014). Međutim autori i dalje navode uspješnost tretiranja injektiranjem stabala protiv *H. fraxineus* gdje su thiabendazol i Allicin značajno smanjili rast nekrotičnih lezija zadržavajući isti obujam nekoliko mjeseci nakon tretiranja do kraja testiranja (Dal Maso et al. 2014). Isto istraživanje potvrdilo je da putem injektiranja stabala, bilo organskim ili sintetskim fungicidima, razvoj bolesti uzrokovane gljivom *H. fraxineus* se može usporiti minimalno na nekoliko mjeseci tijekom vegetacije i tijekom dormantnog perioda. Istraživanja inhibitornog antifungalnog i fungicidnog efekta ekstrakta *Allium* spp. vrsta prema *Aspergillus niger*, *A. flavus* i *A. fumigatus* otkrilo je da inhibitorni efekt opada s porastom temperature i vremena inkubacije (Yin & Tsao 1999). Također je istraživanje pokazalo da dodatkom octene kiseline u Allicin inhibicija postaje jača i trajnija.

Testiranjem hrvatskih izolata patogena *H. fraxineus* na djelovanje Allicin sredstva za zaštitu bilja potvrdilo je ranija istraživanja, te se Allicin pokazao kao djelotvorno sredstvo suzbijanja patogena smanjenjem rasta i fruktifikacije izolata gljive, te redukcijom rasta nekroza kod već inficiranih sadnica. Kurativne metode zaštite primjenom sredstva direktno na micelij gljive bile su učinkovitije od protektivnih metoda suzbijanja iako niti jedna metoda *in vitro* nije imala

ciljani efekt 100%-tne uspješnosti. Protektivna metoda je bila manje uspješna vjerojatno zbog lakog i brzog hlapljenja Allicina, te relativno brzog gubljenja svojstava pri višim temperaturama u agar mediumu tijekom pripreme hranidbene podloge. Također u praćenju rasta izolata vidi se tendencija samnjenja djelotvornosti sredstva s vremenom, te nakon 14 dana sredstvo u potpunosti gubi svoju djelotvornost i preživjeli izolati nastavljaju s normalnom stopom rasta. Fruktifikacija izolata slijedila je trend smanjene produkcije konidija kod izolata koji su bolje reagirali na Allicin sredstvo odnosno koji nisu pokazivali rast nakon tretiranja. Izolati koji su preživjeli tretiranje imali su pojačanu fruktifikaciju, što dovodi do veće rekombinacije gena i produkcije rezistentnijih patotipova. Fruktifikacijska hiperprodukcija nastaje kao posljedica aktivacije obrambenog mehanizma gljive za preživljavanje, što nam govori da neprimjerene i manje doze Allicin sredstva mogu izazvati suprotan efekt, te pojačati širenje patogena.

### **4.3. Otpornost običnog i poljskog jasena na patogena *Hymenoscyphus fraxineus***

#### **4.3.1. Umjetne inokulacije i testovi patogenosti običnog i poljskog jasena**

##### **4.3.1.1. Istraživanje utjecaja temperature na rast patogena i tvorbu nekroza**

Temperatura ima veliki utjecaj na rast i razvoj gljivičnih patogena. Klasiranje kolonija gljiva sukladno njihovim graničnim temperaturama razvoja je standardni postupak u fitopatologiji kako bi se utvrdio spektar uvjeta koji podržavaju preživljavanje patogena. Klasiranje gljiva u psikrofilne, mezofilne i termofilne kategorije sastavni je dio tog procesa (Griffin 1981). Testiranje kultura *in vitro* ukazao je na postojanje velike varijabilnosti između izolata sukladno graničnim vrijednostima, dok su optimalne temperature rasta bile u prosjeku 20 - 22 °C iako su neki izolati rasli najbolje na 15 °C ili 25 °C (Kowalski & Bartnik 2010). U istom istraživanju dokazan je varijabilitet izolata s obzirom na granične temperature budući da su izolati rasli u od 5 – 25 °C, s time da je četiri od 30 izolata raslo i na 30 °C. Slične rezultate dobili smo i mi u istraživanju *in vitro* pri testiranju graničnih temperatura rasta te zaključili da 100% izolata ima sposobnost rasta od 15 – 25 °C, 72,7% izolata ima mogućnost rasta na temperaturama <10 °C, dok niti jedan izolat nije imao sposobnost rasta iznad 30 °C. Testiranja *in vitro* imaju poveznicu, te su vrlo dobar pokazatelj na koji način se pojedini izolati mogu ponašati *in vivo*, jer je temperatura jedan od ključnih preduvjeta razvoja gljive, te direktno utječe i sastavni je dio morfoloških karakteristika gljive. Neki od autora pokušali

su granične temperaturne vrijednosti otkrivene za rast izolata uvećati, budući da su temperaturni ekstremi visokih temperatura ukazali na zastavljanje rasta izolata, te iskoristiti iste u svrhu sterilizacije gljive u sadnicama jasena (Hauptman et al. 2013). Naš cilj bio je vidjeti ponašanje izolata *in vivo* u inficiranim sadnicama običnog jasena, te rast i razvoj nekroza ovisno o temperaturnim razlikama. Utvrdila se korelacija testiranja *in vitro* i *in vivo* na način da optimalne temperature ( $21 \pm 2$  °C) ubrzavaju rast gljive i samim time razvoj i pojavu nekrotičnih lezija na biljkama, te da visoke i niske temperature usporavaju rast gljive i smanjuju pojavu nekroza. Dokazali smo da temperatura ima direktan utjecaj na rast i razvoj nekrotičnih lezija u prirodi koji je asociran s gljivičnim patogenom *H. fraxineus*. Iako su vanjske temperature imale visoku fluktuaciju minimalnih i maksimalnih vrijednosti, prosječna dnevna temperatura zraka varirala je u granicama između 14,6 – 27 °C. Većinu vremenskog razdoblja testiranja konstantna temperatura od 23 °C bila je viša od temperature u prirodnim uvjetima, dok je temperatura od 23 °C bila u granicama optimalne temperature za rast izolata gljive. Niže temperature od optimuma, te visoke temperaturne fluktuacije odrazile su se negativno na razvoj nekroza. Time smo potvrdili ne samo da temperatura značajno utječe na brzinu pojave simptoma i nekrotičnih lezija, što dovodi u konačnici do odumiranja stabala jasena, već i to da niže temperature od optimuma mogu jednako značajno narušavati brzinu rasta micelija i tvorbu nekroza kao i visoke temperature. Rezultati su ukazali da konstantna temperatura od 23 °C povoljnije djeluje na rast nekroza od promijenljivih prirodnih uvjeta koji su u periodu mjerenja temperaturom znatno varirali iznad i ispod optimalnih uvjeta (Slika 62). Statistička analiza ukazala je da ne postoji statistički značajna razlika u rastu nekroza prema temperaturi ( $p=0.128$ ). Međutim, grafovi distribucije rasta nekroza (Slika 63), kao i graf prsječnog rasta nekroza kroz period praćenja (Slika 61) ukazuju jasno da postoji značajna razlika. Statističku analizu treba uzeti s rezervom budući da zbog malog broja uzoraka nije u ovom slučaju pouzdana.

#### 4.3.1.2. Istraživanje utjecaja domaćina na rast patogena i tvorbu nekroza

Više istraživanja utvrdilo je mogućnost infekcije gljive *H. fraxineus* na različitim vrstama jasena (Kirisits & Schwanda 2015; Schwanda & Kirisits 2016; Kirisits et al. 2010; Hauptman et al. 2016). Nekoliko istraživanja utvrdilo je da postoje razlike u rastu micelija izolata gljive *in vitro* ili ekstrakata lišća pojedinih domaćina u različitom hranidbenom mediumu (Carrari et al. 2015; Schwanda & Kirisits 2016; Kirisits et al. 2009; Kowalski & Bartnik 2012). Koliki

zapravo utjecaj ima sama vrsta jasena kao domaćina na razvoj i pojavu nekroza uzrokovanih infekcijom gljivom *H. fraxineus*, te postoji li povezanost tih rezultata s rezultatima rasta micelija na hranidbenoj podlozi s dodacima ekstrakta lišća pokušalo se utvrditi ovim istraživanjem. Rezultati su pokazali da rast nekroza kod poljskog jasena je značajno manji u periodu motrenja od 60 dana nego kod običnog jasena, te iako slijede isti stupanj rasta u prva dva tjedna nakon toga rast nekroza kod poljskog jasena počinje zaostajati za običnim jasenom pri istim uvjetima na konstantnoj temperaturi od 23 °C. Razlog tome može biti osjetljivost ili rezistentnost pojedinih genotipova upotrijebljenih sadnica u istraživanju, budući da je 10 testiranih sadnica za svaku vrstu bilo različitih genotipova. Isto tako moguće je da su razlike u nekrozama uzrok bolje prilagodbe izolata *H. fraxineus* na obični jasen kao domaćina, s obzirom da je izolat upotrijebljen u istraživanju (Zalesina L1) izoliran iz tkiva običnog jasena. Statističke analize pokazale su da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između rasta nekroza ovisno o vrstama domaćina (običnog i poljskog jasena). Da bi se utvrdio pravi razlog varijabilnosti duljina nekrotičnih lezija, potrebno je izvršiti dodatna istraživanja s više sadnica običnog i poljskog jasena koje su istog genotipa, te omogućiti inokulaciju sadnica s genotipima izolata koji su izolirani i iz običnog i iz poljskog jasena.

#### 4.3.1.3. Istraživanje osjetljivosti odabranih klonova poljskog jasena

Neki autori su ukazali na unutarklonsku varijabilnost u testovima osjetljivosti klonova, koja se pokazala kod genetičkih pokusa rezistentnosti klonova u Litvi (Pliūra et al. 2014), što može biti povezano s metodom vegetativne propagacije koja je upotrijebljena za produkciju klonskih sadnica. U Hrvatskoj kao i u Litvi metoda propagacije koja je upotrijebljena, temeljila se na metodi cijepljenja, a porijeklo za podlogu biljaka u Hrvatskoj bile su prirodne sastojine poljskog jasena (*F. angustifolia*), te njihov genotip nije poznat. Dakle, između rameta jednog klona postoje nepoznati genotipovi u podlozi sadnica koji mogu značajno utjecati na dinamiku rasta sadnica, kao i na moguću predispoziciju ili osjetljivost biljke na patogena.

Procesom inokulacije otkrilo se značajno povećanje progresije bolesti u prva četiri mjeseca od početka procesa inokulacije u testovima osjetljivosti klonova. Razvoj simptoma, značajnost oštećenja, te razvoj nekroza otkriveno je u 97% rameta uključenih u testiranje, što je ukazalo na evidentnu osjetljivost klonova poljskog jasena na patogena. Ovaj rezultat nije neuobičajen, te koincidira s ostalim istraživanjima prirodne osjetljivosti i rezistentnosti na patogena *H. fraxineus*, posebice u prvom testiranju potomstva gdje rezistentna svojstva pokazuju veliku

varijabilnost u prvoj godini istraživanja (McKinney et al. 2011; Pliūra et al. 2011; Enderle et al. 2013). Također, 54% biljaka je bilo mrtvo ili u kritičnom stanju nakon prve godine motrenja progresije bolesti, što je ukazalo na kontinuirano slamanje svojstva rezistentnosti prema patogenu kod većine klonova. Mnogi autori su ukazali na slične rezultate, čak i nakon prve selekcije rezistentnih klonova i testiranja potomstva, kao što je to pokazalo testiranje potomstva 2005. godine u Litvi s selektiranim rezistentnim klonovima i nekontinuiranost u svojstvima rezistentnosti u kasnijim testiranjima (Pliūra et al. 2014). U Njemačkoj stupanj širenja bolesti, u testiranju provenijencije postavljenim 2005. godine, povećao se s 13% 2007. godine do čak 94% u 2012. godini (Enderle et al. 2013). U klonskom istraživanju u Danskoj na dvije lokacije, simptomi bolesti tijekom tri godine povećali su se sa 33% na 55 % (McKinney et al. 2011). Samo nekoliko istraživanja je utvrdilo pad stupnja oštećenosti jasena, kao što je istraživanje provedeno u Švedskoj, koje je utvrdilo samo jednogodišnji pad stupnja oštećenja dok u petogodišnjem vremenskom trendu postoji povećani stupanj oštećenja (Stener 2013).

U klonskom istraživanju u Austriji srednja vrijednost intenziteta oštećenja jasena dosegla je tek 18,1% u 2009. godini i 17,6% u 2010. godini (Kirisits & Freinschlag 2012). Rezultati opadanja procjene oštećenosti su objašnjeni na način da bolesna oštećena stabla često reagiraju intenzivno s formiranjem novih epikormičkih izbojaka da kompenziraju gubitak mrtvih izbojaka, što rezultira privremnim lažnim izgledom smanjenog intenziteta sušenja i oštećenja koje je patogen izazvao. Također je pretpostavljeno da klimatski faktori mogu pridonijeti smanjenjem intenziteta bolesti (Kirisits & Freinschlag 2012). Stoga, defolijacija krošnje ovisi značajno o svojstvima sastojine i mikrolokaciji, te je više indikator sveukupne vitalnosti stabla nego osjetljivosti na *H. fraxineus* (Enderle et al. 2015). Zbog toga je udio živića (epikormičkih izbojaka) u u krošnji bolji indikator stupnja infekcije bolesti ili osjetljivosti stabala (Enderle et al. 2015). Jednogodišnji monitoring stope bolesti kod klonova može značajno varirati, te je svako istraživanje testiranja potomstva utvrdilo veliku stopu pojavnosti bolesti i uniformnije rezultate nakon tri ili više godina praćenja.

Neovisno o visokoj stopi pojavnosti bolesti, mortalitet stabala je dosegao gotovo 49% tijekom našeg jednogodišnjeg istraživanja, dok se u Litvanskom istraživanju rezistentnosti klonova mortalitet povećavao vrlo slabo i dosegao samo 1,2% (Pliūra et al. 2014). Takav rezultat je očekivan i može se objasniti dugom vremenskom izloženošću patogenu u Litvi, te kao posljedicu procesa intenzivne prirodne selekcije u sastojinama običnog jasena u Litvi. U Hrvatskoj plus stabla i sadnice za uspostavu klonova u klonskim sjemenskim plantažama su

sakupljeni u prirodnim sastojinama poljskoj jasena prije pojave nove bolesti jasena, gdje prirodna selekcija pogonjena osjetljivošću pojedinih genotipova poljskog jasena nije još bila započela. Također starost sadnica koje su upotrijebljene u pokusima u Hrvatskoj mogle su biti razlog visoke stope mortaliteta, budući da su mlada stabla osjetljivija na napad patogena, a biljke upotrijebljene u pokusima u Litvi su bile starije (Pliūra et al. 2014). S druge strane, klonska istraživanja u Švedskoj su ukazala na stopu mortaliteta od 33% tijekom petogodišnjeg perioda (Stener 2013). Ako uzmemo u obzir rezultate prvog Litvanskog testiranja potomstva (serije klonova iz 2005. godine), koji je mnogo sličniji našem prvom pokusu testiranja osjetljivosti s obzirom na prva istraživanja u pronalaženju mogućih rezistentnih klonova, stopa mortaliteta dosegla je gotovo 90% u petogodišnjem periodu (Pliūra et al. 2011). Sekundarni testovi potomstva uvijek ukazuju na značajno manju stopu mortaliteta zbog jačih atributa rezistentnosti i/ili tolerantnosti unutar grupe klonova koja je već prethodno selektirana jer je iskazivala genetski rezistentne attribute.

U ovim istraživanjima, niti jedan od testiranih klonova nije ukazao na totalnu rezistentnost prema uzročniku sušenja jasena *H. fraxineus*, međutim nekoliko ih je pokazivalo reduciranu osjetljivost, to je također u suglasnosti sa sličnim objavljenim istraživanjima koji se odnose na rezistentnost genotipova običnog jasena (McKinney et al. 2011; Stener 2013; Pliūra et al. 2014). Istraživanje je pokazalo veliku varijabilnost s srednjim stupnjem oštećenja između genotipova, konzistentno s istraživanjem obavljenim u Danskoj gdje je oštećenje bilo 1 – 69 % (McKinney et al. 2011) i u Austriji gdje je oštećenje bilo 0 – 80% (Kirisits & Freinschlag 2012). S obzirom na ovo istraživanje osjetljivosti klonova, najmanje osjetljivi ili najtolerantniji klonovi na patogena *H. fraxineus* bili bi klonovi iz klonske sjemenske plantaže Čazma (BJ25 i BJ38), te dva klona iz klonske sjemenske plantaže Nova Gradiška (NG03 i NG31). Iako klon NG03 prema kumulativnoj vrijednosti aritmetičke sredine ukupne duljine nekroza neovisno o izolatu spada u najtolerantnije klonove, zabilježen je visok stupanj varijabilnosti između dva izolata patogena što predstavlja mogući problem u daljnjoj selekciji, budući da klon NG03 predstavlja veliku tolerancu na jedan izolat te ujedno i veliku osjetljivost na drugi izolat istoga patogena. Zbog te varijabilnosti klon NG03 nije prihvatljiv kao klon smanjene osjetljivosti na patogena, isključen je iz selekcije tolerantnijih klonova i ne preporuča se za daljnja testiranja. Klonovi BJ25, BJ38 i NG31 pokazali su izvjesnu reduciranu osjetljivost na patogena i preporučuju se za daljnja testiranja otpornosti. Da li ti klonovi imaju sposobnost zadržati taj stupanj redukcije ili je to samo varijanca zavisna o genotipovima izolata, ili nivou patogenosti izolata i njegovoj sposobnosti da slomi



rezistentnost klonova, ili ovisi o infekcijskom pritisku susjednih bolesnih sastojina, još se mora utvrditi daljnjim istraživanjima. Ukoliko rezistentnost ostane trajna, vegetativna propagacija bi mogla biti vrlo efikasna opcija uzgoja, s obzirom da se rezistentnost/tolerantnost kod jasena obično manifestira više na individualnom nivou genotipa nego na nivou populacije ili provenijencije (Douglas et al. 2013). Također koeficijent varijacije dužina nekroza pokazuje nam da samo mali postotak testiranih klonova ima mali koeficijent varijacije što korelira s uniformnim rezultatom u duljini nekroza. Samo rezultat s malim duljinama nekroza i malim koeficijentom varijacije se može razmatrati za test potomstva.

Istraživanja na osjetljivost poznatih genotipova poljskog jasena na djelovanje gljivičnog patogena *H. fraxineus* su još uvijek podcjenjena tema, te iako je mnogo posla obavljeno na polju genetske rezistentnosti klonova običnog jasena na spomenutog patogena, poljski jasen kao vrsta ima potencijal utvrđivanja novih rezultata. Odgovor ove vrste na patogena na nivou iskazane virulentnosti patogena i sposobnosti formiranja nekroza, otkrio je neke rezultate koji značajno odstupaju od ranijih istraživanja genotipa kod običnog jasena. Istraživanja stope rasta izolata na različitim mediumima s ekstraktima lišća autohtonih Hrvatskih vrsta jasena, otkrila su razlike u stopama rasta. Ovo istraživanje može biti dobro za daljnja istraživanja odnosa patogen – domaćin.

Testiranje genotipova poljskog jasena na osjetljivost prilikom djelovanja patogena doprinijelo je informacijama o mogućnostima zadržavanja rezistentnih svojstava poljskog jasena, koja bi trebala biti upotrijebljena u daljnjim istraživanjima rezistentnosti u dodatnim klonskim ispitivanjima, te bi novi ciklus selekcije trebao osigurati potencijal dobivanja seta genetski rezistentnih klonova za križanje u oplemenjivanju drveća i za utvrđivanje i postavljanje novih genetski rezistentnih sjemenskih plantaža, kao i njihovo daljnje vegetativno razmnožavanje. Za bolje rezultate, više genotipova iz sjemenskih plantaža treba testirati za prvu selekciju, tako da najosjetljivije jedinice mogu biti izuzete iz sjemenskih plantaža zbog svojih negativnih svojstava u osjetljivosti na patogena *H. fraxineus*.

#### **4.3.2. Kemijska analiza lišća odabranih klonova poljskog jasena**

Poznavanje promjena u koncentraciji biogenih elemenata u lišću biljke prilikom infekcijskog procesa gljivičnog patogena nužno je za razvijanje metoda kontrole bolesti.

Većina klonova po pojedinom elementu razlikovala se samo s jednim izolatom patogena u odnosu na kontrolu, međutim kod kalija (klon BJ38) i cinka (klon BJ32) se ukazala statistički

značajna razlika u klonovima na oba izolata. To povećanje vrijednosti većine elemenata s obzirom na izolat1 govori u prilog utjecaja genetske varijabilnosti patogena na koncentraciju elemenata u lišću prilikom infekcijskog procesa. Vrijednosti kalija i cinka su značajno povećane u inficiranim sadnicama u odnosu na kontrolu. Kod svih klonova vrijednosti cinka bile su ispod granične vrijednosti nedostatka elementa. Uočene su povećane vrijednosti cinka na inficiranim biljakama klona BJ32 međutim niti te povećane vrijednosti, u odnosu na druge klonove, nisu prelazile graničnu vrijednost nedostatka elementa. Vrijednosti kalija za klon BJ38 kod inficiranih sadnica dosežu gotovo prag optimuma elementa, što su najveće vrijednosti kalija u testiranju, dok kontrolne sadnice (neinficirane) jedva prelaze granicu nedostatka vrijednosti elementa. Takvi rezultati povećanja vrijednosti kalija i cinka kod inficiranih sadnica poljskog jasena razlikuju se od istraživanja (Cekstere et al. 2013) na običnom jasenu. S obzirom da se radi o drugoj vrsti domaćina moguće su i razlike u rezultatima.

Statistički značajne pozitivne korelacije elemenata i duljine nekroza prikazane su na elementima N, K, Mg, Ca i Mn, te negativna statistički značajna korelacija na ugljiku. Očekivana je bila pojava negativne korelacije s duljinama nekroza s obzirom da drugi autori u istraživanjima navode značajno niže koncentracije N, Ca, Mg i Cu u analizi lišća *F. excelsior* inficiranih biljaka patogenom *H. fraxineus*, te neznatno niže koncentracije K, S, Mn i Zn u usporedbi s nezaraženim biljkama (Cekstere et al. 2013). Pozitivne korelacije duljine nekroza i vrijednosti koncentracije elemenata lista navode na zaključak da poljski jasen usljed djelovanja patogena akumulira biogene elemente u list. Translokacija nutrijenata kao obrana od napada patogena već je ranije istraživana (Divon & Fluhr 2007), te postoji mogućnost da biljka povećanom dostupnošću biogenih elemenata u lisnim organima osigurava odvijanje fizioloških obrambenih procesa. Također postoji mogućnost da prilikom razaranja i smrti stanica, produkcijom toksina, hidrolitičkih enzima i drugih proteina povezanim tvorbom nekroza, patogen lizom stanica domaćina otpušta u izvanstanične prostore hraniva koja su tada lako pokretljiva u druge organe kao što su lisni organi (Divon & Fluhr 2007). Stoga je moguće da su kod mlađih biljaka poljskog jasena koncentracije biogenih elemenata, u određenom periodu infekcije, povećane u lisnim organima u odnosu na neinficirane biljke.

Ugljik je jedini biogeni element koji je pokazao statističku značajnu negativnu korelaciju s duljinama nekroza zaraženih klonova, te šest od ukupno devet klonova za ugljik pokazuje smanjene vrijednosti u odnosu na kontrolne (neinficirane) sadnice. Kod većih nekroza jači je napad patogena na biljku, čime se smanjuje vitalitet biljke i debljinski prirast što je već

dokazano u svim testovima inokulacije u ovom istraživanju. Samim time potreba za ugljikom je manja jer se smanjuje potreba za stvaranjem drvene tvari, te je fokus usmjeren na obrambene reakcije biljke prema patogenu, a ne na rast biljke.

Granične vrijednosti nedostatka, optimuma i povišene razine biogenih elemenata lišća jasena preuzete su iz publikacija (Van den Burg 1985; Van den Burg 1990; Weber and Bahr 2000; Weber-Blaschke et al. 2008). Koncentracije B, Fe, Mn, Ca i Mg bile su više od granične vrijednosti nedostatka, u svim testiranim klonovima. Vrijednosti su bile niže od granične vrijednosti nedostatka za Zn, N i K. Generalna insuficijencija Zn, N i K bez obzira na zarazu, mogla je biti prouzrokovana duljim uzgojem sadnica u kontejnerima s ograničenim količinama dostupnih hraniva.. Velika potreba za dušikom i kalijem tijekom rasta mladih sadnica poljskog jasena, očito je iscrpila kapacitet kontejnera za tim elementima.

Kod testiranja osjetljivosti klonova na djelovanje patogena *H. fraxineus* ustanovili smo da su klonovi BJ25, BJ38, NG03 i NG31 najtolerantniji na djelovanje patogena. Ti klonovi također pokazuju smanjene vrijednosti nekih elemenata u odnosu na kontrolu. Klonovi BJ25 i BJ38 ukazuju smanjene vrijednosti nekih elemenata, dok se kod klonova NG03 i NG31 ukazuje smanjenje vrijednosti drugih elemenata, što se može objasniti utjecajem genotipa biljke gdje klonovi BJ25 i BJ38 pripadaju jednoj, a NG03 i NG31 drugoj sjemenskoj provenijenciji. Jedini element koji je pokazao smanjene vrijednosti kod sva četiri klona bio je mangan.

Povišene vrijednosti određenih elemenata u odnosu na kontrolu, također se bolje podudaraju unutar provenijencijske grupacije klonova BJ25 i BJ38, te NG03 i NG31, što jasno ukazuje na utjecaj genetskog varijabiliteta domaćina na koncentracije biogenih elemenata u lišću. Jedini element koji je povećao koncentraciju u sva četiri klona je cink. Utjecaj smanjenih vrijednosti mangana i povećanih vrijednosti cinka na djelovanje patogena *H. fraxineus* trebalo bi detaljnije istražiti. Postoji mogućnost da su smanjene vrijednosti mangana i povećane vrijednosti cinka povezane sa smanjenom aktivnosti patogena.

Detektirane koncentracije biogenih makroelemenata u lišću poljskog jasena varirale su u odnosu na vrijednosti dobivene u drugim istraživanjima na običnom jasenu. U ovom istraživanju generalno niže vrijednosti elemenata od normalnih za *Fraxinus* vrste prikazuju elementi  $N < 2.00\%$  i  $K < 1.2\%$ , a povećane vrijednosti imaju  $Ca > 1.5\%$  i  $Mg > 0.35\%$  što se poklapa i s drugim istraživanjima (Niinemets & Kull 2005; Hagen-Thorn et al. 2004; Hofmeister et al. 2004). Deficijencija kalija elemenata u lišću *F. excelsior* prilikom infekcije patogenom *H. fraxineus* otkrivena je i u Litvi (Cekstere et al. 2013). Za mikronutrijente kao

što su Mn i Zn, također su vrijednosti u ovom istraživanju bile manje od normalnih vrijednosti (Mn>55, Zn>19) koje su prikazane drugim istraživanjima (Hagen-Thorn & Stjernquist 2005), ali se poklapaju s smanjenim vrijednostima istraživanja mikronutrijenata lista *F. excelsior* u Litvi (Cekstere et al. 2013). Vrijednosti bora odgovarale su normalnim vrijednostima elementa (B>26 mg/kg) kao i kod istraživanja (Hagen-Thorn & Stjernquist 2005), dok je u istraživanju u Litvi bor bio ispod granične vrijednosti nedostatka (Cekstere et al. 2013). Generalno odstupanje vrijednosti od istraživanja u Litvi (Cekstere et al. 2013) je očekivano s obzirom da je kod inficiranih stabala uzorak lišća bio inficiran gljivom *H. fraxineus*, dok je kod zdravih stabala uziman uzorak zdravog lista. U našem istraživanju svi su uzorci lišća (i s zdravih i s inficiranih sadnica) bili bez prisutnosti patogena. Gljiva je u njihovom istraživanju za svoje potrebe rasta i razvoja iscrpila hraniva u listu i na takav način prouzrokovala deficijenciju elemenata, dok u našem istraživanju usporedbe zdravog lista kod zdravih i zaraženih sadnica rezultati ukazuju na akumulaciju elemenata u listu kod zaraženih sadnica.

Razlike u akumulaciji nutrijenata mogu biti posljedica varijacija genotipova klonova (domaćina), genotipova gljive (patogena), vremena uzorkovanja, uvjeta i dostupnosti hraniva iz tla i slično. S obzirom na vrijednosti pojedinih nutritivnih elemenata nije se pokazala uniformnost rezultata već interakcija genotipa patogena i domaćina utječe na koncentracije pojedinog biogenog elementa. Kod željeza se tako smanjenje koncentracije elementa manifestiralo u 7/9 klonova, kod ugljika i mangana u 6/9 klonova, kalcija 4/9 klonova, kod bora i magnezija se smanjenje elementa manifestira u 3/9 klonova, dok su se cink, dušik i kalij smanjili u samo 2/9 klonova. Istraživanja u Litvi (Cekstere et al. 2013) otkrivaju da koncentracija željeza između nezaraženih i zaraženih stabala značajno odstupa, te da su povećane vrijednosti željeza u zdravim stablima (gornja granica optimalnih vrijednosti) dok su kod bolesnih stabala vrijednosti željeza na donjoj granici optimuma. To se poklapa i s ovim istraživanjem gdje su smanjene vrijednosti željeza u inficiranim sadnicama s obzirom na kontrolne smanjene u čak 7/9 klonova. Generalna insuficijencija kalija se može objasniti povećanim koncentracijama kalcija i magnezija u lišću klonova, dok se insuficijencija dušika i cinka može objasniti ograničenom količinom tih elemenata u kontejnerima u kojima su se biljke nalazile tijekom dvije godine istraživanja.

#### **4.3.3. Fenološka istraživanja odabranih klonova poljskog jasena**

Trenutna genetska raznolikost jasena u mnogim europskim zemljama mogla bi biti nedovoljna za buduću adaptaciju i održivost. Značajna varijacija u stupnju oštećenja

individualnih stabala može se uočiti u prirodnim populacijama vrste *F. excelsior*, te samo 2-3% stabala ostaje bez vidljivih simptoma bolesti (McKinney et al. 2011; Pliūra et al. 2014). Međuklonska varijabilnost tijekom godina istraživanja ukazala je na pozitivnu korelaciju veće stabilnosti i uniformnosti između rameta s obzirom na povećanje starosti stabala. Udio simptomatskih rameta unutar klona za bolest odumiranja jasena, bio je vrlo varijabilan tijekom godina istraživanja (Pliūra et al. 2014). Rezultati istraživanja u Švedskoj (Stener 2013) ukazala su na ekstremno rijetku pojavu rezistentnih stabla u prirodnim sastojinama jasena, sugerirajući da će biti potrebno selekcionirati veliki broj individualnih kandidata za testove osjetljivosti. Također, u kontekstu globalne promjene klime, važno je znati strukturu genetske varijabilnosti poljskog jasena, posebice u okvirima adaptivnog potencijala vrste kao što je rast, sposobnost preživljavanja i fenologije listanja. Genetsku varijaciju kvantitativnih svojstava poljskog jasena u Hrvatskoj istraživali su (Bogdan et al. 2007) dok su utjecaj okolišnih čimbenika na prolistavanje poljskog jasena opisali u istraživanju (Andrić & Kajba 2017).

S rezultatima prikupljenim fenološkim motrenjima možemo zaključiti i klasirati klonove u rane i kasne grupe s obzirom na početak listanja, ali i odbacivanje lista u jesen što ima visoku praktičnu vrijednost, ne samo za upravljanje i održavanje klonskih sjemenskih plantaža, već i za produkciju i distribuciju kvalitetnog šumskog reproduktivnog materijala kao izuzetno važno adaptivno svojstvo za budućnost. Svaka fenofornna grupa predstavlja važnu karakteristiku povezanu s štetnicima i kukcima, kao i s pojavom kasnog proljetnog mraza. Nekoliko istraživanja utvrdilo je korelaciju između ranog odbacivanja lista i osjetljivosti na patogena *H. fraxineus* (McKinney et al. 2011; Bakys et al. 2013; Stener 2013; Hauptman et al. 2016). Istraživanja su potvrdila da otporni genotipovi listaju ranije i da imaju kraći vegetacijski period, odnosno da ranije odbacuju list. Duljina vegetacijskog perioda definirana je u četiri grupe s obzirom na proljetne podatke fenologije listanja i jesenske fenologije odbacivanja lista. Fenološki podaci dobivani su opažanjem stabala iz klonskih sjemenskih plantaža starosti (u trenutku opažanja) 10 i 8 godina, što predstavlja dovoljan period za stabilnost fenoloških osobina. Kod fenologije listanja prosječna razlika u danima između klastera rane fenotipske grupe i klastera kasne fenotipske grupe iznosila je 7 dana (5 – 9 dana), što je nešto kraći period od 9,5 dana (11 – 8 dana) u istraživanju (Andrić et al. 2016) fenologije listanja klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži Nova Gradiška. Razlog tome je manji uzorak klonova u ovom istraživanju, te miješana struktura uzorka klonova iz dvije različite sjemenske regije.

Prema biologiji vrste *H. fraxineus* lišće jasena predstavlja važnu infekcijsku početnu točku za ulazak patogena u domaćina (Kirisits et al. 2009; Cleary et al. 2013). Velike količine spora iz plodnih tijela gljive *H. fraxineus* s primoinfekcijskom sposobnošću se stvaraju u ljeto i ranu jesen, te se smatra da je to najvažniji put širenja infekcije gljive preko lista u izbojke (Timmermann et al. 2011). Istraživanja su pokazala da rano odbacivanje lista u jesen može biti posljedica lisnih infekcija, te da postoji pozitivna korelacija intenziteta odbacivanja lista s oštećenošću krošnje na poljskom jasenu (Hauptman et al. 2012; Hauptman et al. 2016). Dakle ranije odbacivanje lista kod teže oštećenih stabala poljskog jasena je slično rezultatima na običnom jasenu u Švedskoj (Stener 2013), dok u Austriji jasna korelacija između oštećenja krošnje i odbacivanja lista nije uspostavljena (Kirisits and Freinschlag 2012). Sličnim istraživanjem u Danskoj (McKinney et al. 2011) u klonskoj sjemenskoj plantaži običnog jasena prikazana je negativna korelacija između intenziteta odumiranja stabala i odbacivanja lista koja je uspostavljena na temelju jesenske promjene boje lista. Sukladno tom istraživanju, donesen je zaključak da stabla s kraćim vegetacijskim periodom (ranijem odbacivanjem lista u jesen) izbjegnu infekciju drvnog tkiva zbog otpadanja lista zajedno s inokulumom prije prelaska patogena u drveno tkivo izbojka, te su stoga manje osjetljivi na infekcije patogenom *H. fraxineus*. Mogućnosti praćenja otpadanja lista u jesen u svrhu utvrđivanja otpornih klonova u budućnosti biti će sve više upitna zbog sve većeg rasprostranjenja areala bolesti (Kirisits & Freinschlag 2012). Ovakva praćenja su moguća samo u sustavu uvjeta praćenja zdravih sadnica, bez utjecaja patogena na ranije odbacivanje lista. U slovenskom istraživanju (Hauptman et al. 2016) zamijećena je pojava novog listanja prije kraja vegetacijskog perioda zbog preranog odbacivanja lista u kolovozu usljed pojave infekcija patogena *H. fraxineus*. Stoga je u tom aspektu prilikom formiranja novog lista pri kraju vegetacijskog perioda teoretski moguće prenošenje infekcije u izbojke i grane prije odbacivanja lista (Hauptman et al. 2016).

Proporcija lisnih infekcija koje dovode do infekcije izbojka su pretpostavljeno relativno male (Krautler & Kirisits 2012) što znači da rano odbacivanje lista, iako inducirano od strane patogena, može uzrokovati izbjegavanje bolesti. Naravno, taj mehanizam ne djeluje uspješno kod svih individua koje rano odbacuju list (Kirisits & Freinschlag 2012). Prema istraživanju u Sloveniji (Hauptman et al. 2016) i Nizozemskoj (Kopinga and de Vries 2013) neke ramete na najzdravijim klonovima su zadržale list do sredine listopada i nisu pokazivale znakove infekcije, stoga se pretpostavlja da postoji određeni obrambeni mehanizam koji spriječava pojavu lisnih infekcija. Temeljem opažanja da rezistentniji genotipovi ranije listaju od

genotipova koji su osjetljiviji (McKinney et al. 2014) izveden je zaključak da su stariji listovi manje osjetljivi na infekciju ili manje primjereni za širenje patogena *H. fraxineus* iz listova u izbojke. Međutim, tu pretpostavku nije potvrdilo Slovensko istraživanje koje nije otkrilo jasnu korelaciju između oštećenosti krošnje i fenologije listanja (Hauptman et al. 2016).

Rezultati ovog istraživanja sukladno fenološkim i inokulacijskim istraživanjima na *F. angustifolia*, ne koreliraju s rezultatima drugih istraživanja na *F. excelsior* (McKinney et al. 2011; Bakys et al. 2013) koji utvrđuju da su klonovi s ranijim listanjem i ranijim odbacivanjem lista manje osjetljivi na djelovanje patogena *H. fraxineus*. Ranije listanje moglo bi biti jedno od važnih karakteristika otpornosti običnog jasena na patogena *H. fraxineus*, kako je navedeno i u istraživanju (McKinney et al. 2011; Bakys et al. 2013; Stener 2013). Međutim, prema ovom istraživanju i istraživanju (Hauptman et al. 2016) ta korelacija nije potvrđena na vrsti *F. angustifolia*.

Sukladno rezultatima utvrđeno je da trećina klonova ima srednju duljinu vegetacijskog perioda (BJ28, NG03 i NG41). Klonovi BJ28 i NG03 pripadaju grupi ranih fenotipova listanja, međutim samo klon NG03 pokazuje tendenciju smanjene osjetljivosti sukladno smanjenim duljinama nekroza kojom bi se potvrdila teorija manje osjetljivih klonova ranijim listanjem (McKinney et al. 2014). Također klon BJ25 koji ima produljeni vegetacijski period pripada grupi ranih fenotipova listanja, te pokazuje značajno smanjenje prosječne duljine nekroza i iskazuje potencijal za daljnja testiranja otpornosti iako zbog svog produljenog perioda vegetacije ne odgovara klasičnom profilu idealnog klona. Idealan klon za nastavak istraživanja osjetljivosti na patogena *H. fraxineus* s obzirom na fenologiju je klon NG31 koji ima kraći vegetacijski period i smanjenu prosječnu duljinu nekroza.

Ako uzmemo u obzir da se proljetna fenologija listanja u određenim slučajevima može pokazati dosta nepouzdana i značajnije varirati s obzirom na okolišne uvjete (Stener 2013), te da je jesenska fenologija u istraživanjima pokazala veću stabilnost nego proljetna fenologija listanja (Stener 2013), i k tome da je biologija patogena *H. fraxineus* povezanija s primoinfekcijama askospora koje se odvijaju u ljetnom razdoblju i da infekcija izbojaka i drvnog tkiva ovisi o vremenu odbacivanja lista i jesenske fenologije (McKinney et al. 2011) može se zaključiti da bi pozornost testiranja klonova trebalo posvetiti klonovima koji rano odbacuju list u jesen, što prema rezultatima ovog istraživanja predstavljaju klonovi NG03 i NG31 (Tablica 36). Prema dobivenim rezultatima nema jake povezanosti između duljine nekroza s duljinom vegetacijskog perioda ili fenotipskom grupom baziranom na fenologiji listanja kao i kod slovenskog istraživanja (Hauptman et al. 2016).

#### 4.3.4. Istraživanje hipovirulentnosti patogena *Hymenoscyphus fraxineus*

Gljivični virusi (mikovirusi) se uobičajeno pronalaze u svim glavnim grupama biljnih patogenih gljiva. U devetom ICTV izvješčaju (International Committee on Taxonomy of Viruses) izlistano je preko 90 mikovirusnih vrsta (Faquet et al. 2005; King et al. 2012). Većina gljivičnih virusa su dvo-lančani RNA virusi (Ghabriel and Suzuki, 2008; Mahy and Van Regenmortel 2009). Dok većina njih nema nikakvog poznatog utjecaja na domaćina, neki od tih virusa uzrokuju oslabljujuće bolesti ili uzrokuju redukciju virulentnosti u njihovim gljivičnim domaćinima (Pearson et al. 2009). Mikovirusna inducirana hipovirulentnost je već dokazana kod uzročnika raka kestenove kore, gljiva *Cryphonectria parasitica* (Anagnostakis 1982; Milgroom & Cortesi 2004; Polashock & Hillman 1994; J J Polashock et al. 1997), kod uzročnika holandske bolesti brijesta, gljive *Ophiostoma ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier 1983; Hong et al. 1999b), kod sive plijesni, *Botrytis cinerea* (Rodriguez-Garcia et al. 2014; Wu et al. 2007), te kod gljive *Sclerotinia homeocarpa* (Deng et al. 2003; Zhou & Boland 1997). Do danas, mikovirusi iz roda *Hypovirus* (porodica Hypoviridae) i *Mitovirus* (porodica Narnaviridae) uzrokuju hipovirulentnost u biljnim patogenima (Nuss 2005). Tip vrste iz roda *Hypovirus* je *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), vjerojatno najistraživaniji virus biljnih patogenih gljiva (Dawe & Nuss 2001). Aplikacija hipovirusa kao agenta biokontrole protiv raka kore pitomog kestena je intenzivno istraživana kako u SAD-u (Anagnostakis 1982; Nuss 1992) tako i u Europi (Rigling 1994; Prospero & Rigling 2013). Sukladno istraživanju upotrebom RNAseq identificirane su virusne sekvence u dva gljivična izolata (Schoebel et al. 2014). Usporedbom sekvenc amino kiselina, u istom istraživanju, identificiran je mikovirus kao pretpostavljeni novi član roda *Mitovirus* (porodica Narnaviridae) koji je nazvan *Hymenoscyphus fraxineus mitovirus 1* (HfMV1). Novi mitovirus je jako varijabilan između europskih izolata i izgleda da se brzo mijenja, što je vrlo obećavajuće za buduća istraživanja i potragu za primjerenim sojom za upotrebu u mjerama biološke kontrole (Schoebel et al. 2014).

Sukladno rezultatima naših istraživanja hipovirulentnosti kod *H. fraxineus* nije dokazana. Iako postoji redukcija nekrotičnih lezija na običnom jasenu s izolatima koji sadrže mitovirus HfMV1, te redukcije rasta nekroza nisu statistički značajne u odnosu na nekroze prouzrokovane izolatima bez mitovirusa HfMV1. Kod poljskoj jasena postoji pojačani rast nekroza i to se može objasniti mlađim sadnicama poljskog jasena, u odnosu na obični jasen, koje mogu iskazivati veću varijabilnost u duljini nekroza ili biti više osjetljive od starijih sadnica. Također postoji suprotnost i nedosljednost rezultata kod poljskog jasena gdje



hrvatski izolat s virusom ispoljava produkciju većih nekroza od izolata bez virusa. To se također može djelomično objasniti relativno osjetljivim i mladim sadnicama, međutim značajne razlike između izolata iskazale su se u izolatima 4-3 (Chevetogne 4II V1M2 - Flouriffoux 3I V0M2) i 1-3 (Čazma K3 V0M2 - Flouriffoux 3I V0M2) što nam govori u prilog tome da kod gljive *H. fraxineus* trenutni sojevi mitovirusa ne iskazuju mogućnosti uzroka hipovirulencije domaćina. Kao i u drugim istraživanjima, prilikom infekcije postoji značajna redukcija promjera od 20,22 – 85,31% na svim inficiranim biljkama u odnosu na kontrolnu skupinu neinficiranih sadnica.

#### **4.3.5. Istraživanje mogućnosti zaštite poljskog jasena injektiranjem Allicin sredstva**

Iz rezultata se može iščitati kako Allicin sredstvo injektiranjem u inficirane sadnice poljskog jasena reducira rast nekroza u odnosu na kontrolnu skupinu. Sredstvo nije u potpunosti zaustavilo rast nekroza u razdoblju praćenja od 30 dana, te nakon prestanka djelovanja sredstva, te slabljenjem njegovog djelovanja nakon 20 dana vidljiva je ponovna reaktivacija djelovanja patogena i širenje nekroza. U rastu nekroza utvrđeno je da su nekroze u rastu prema gore stagnirale, dok su nastavile svoj rast u smjeru prema bazi stabljike. Ta pojava je vrlo vjerojatno posljedica ubrizgavanja Allicin sredstva u ksilemsko staniće uokolo nekrotičnih lezija gdje je gibanje biljnih sokova u ascendentnom smjeru prenosilo sredstva u više djelove biljke, dok je istovremeno u kambijskom sloju donja strana nekrotičnog tkiva bila izložena dodirnoj točki pritjecanja novih biljnih sokova bez prisustva sredstava zaštite. To je omogućilo patogenu da širi nekroze u descendentnom smjeru. Budući da kroz mrtvo nekrotično tkivo u kojem se nalazi patogen nema kolanja biljnih sokova, taj je dio nekrotičnog tkiva ostao u biljci kao trajni izvor novih zaraza do kojih ni najdjelotvornija sredstva ne mogu doprijeti. Nemoguće je tretirati nekrotični dio mrtvog stanića biljke. Moguće je samo zaustaviti ili usporiti daljnju progresiju nekrotičnih lezija uz pomoć sredstava zaštite. Allicin sredstvo nije zaustavilo rast nekroza u razdoblju praćenja od 30 dana, međutim značajno usporavanje rasta nekroza moglo bi naći svoju primjenu u cilju prevencije napredovanja bolesti tijekom kritičnog vegetacijskog perioda.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja o ulozi patogene gljive *Hymenoscyphus fraxineus* u odumiranju jasena (*Fraxinus* spp.) u Republici Hrvatskoj, navode se sljedeći zaključci:

1. Gljivični patogen *H. fraxineus* u Republici Hrvatskoj prisutan je od 2009. godine, a do početka 2016. godine proširio se i etablirao na gotovo čitavom području areala rasprostranjenosti običnog i poljskog jasena. Gljivični patogen nije prisutan u termofilnim zajednicama crnog jasena na mediteranskom području. Daljnje širenje prema jugu i istoku nije osobito vjerojatno zbog nepovoljnijih klimatskih uvjeta za *H. fraxineus*. U budućnosti su moguće velike fluktuacije u aktivnosti i prisustvu patogena u nizinskim područjima Hrvatske.
2. Oštećenost sastojina većinom korelira s vremenskom prisutnosti bolesti na određenom području. Jako oštećene sastojine su upravo sastojine običnog jasena u kojima se bolest najranije pojavila. Umjerena osutost u srednjoj i nizinskoj Hrvatskoj korelira s relativno kratkim vremenskim periodom infekcije i s neprimjerenim klimatskim okolnostima za patogena. Blaga osutost sastojine na krajnjem istočnom dijelu nizinske Hrvatske korelira s najrecentnijim infekcijskim razdobljem.
3. Postoji pozitivna korelacija stupnja oštećenosti i infekcijskog potencijala gljive kod običnog i poljskog jasena. Varijacije prosječnog broja apotecija po mjesecima razlikuju se kod poljskog i običnog jasena. Korelacija broja apotecija po mjesecima mijenja se ovisno o nekom trećem faktoru (pretpostavljeno o temperaturi zraka i količini padalina).
4. Najčešće izolirane vrste gljiva iz tkiva jesena, osim vrste *H. fraxineus*, ne razlikuju se od vrsta izoliranih u drugim istraživanjima. Nisu se ukazale značajne razlike u pojavnosti vrsta gljiva između domaćina. Izuzetak je vrsta *Hysterographium fraxini* koja je nađena samo na poljskom i crnom jasenu, te *Fusarium solani* i *Bionectria ochroleuca* koje su nađene samo na poljskom jasenu. Među izoliranim vrstama kao najpatogenije smatraju se gljive *Botryosphaeria stevensii*, te *Hysterographium fraxini* i *Phoma exigua*.

5. Čiste kulture *C. fraxinea* izolata koje su rasle *in vitro* pokazuju značajnu varijabilnost. Utvrđena su dva glavna morfotipa, te je morfotip2 s mnogo više subdivizija (8) od morfotipa1 (2 subdivizije).
6. Niske temperature djeluju inhibitorno na rast istraživanih izolata, a visoke temperature djeluju inhibitorno i sterilizirajuće. Izolati rastu do 43,10 puta sporije na temperaturi od 10 °C nego na 20 °C pri kojoj izolati najbrže rastu. Hrvatski izolati imaju veću stopu preživljavanja visokih temperatura od belgijskih izolata. Preživljavanje izolata nakon tretiranja visokim temperaturama rezultira povećanjem rasta izolata do 9,14 puta vraćanjem istih u optimalne uvjete.
7. Idiomorf Hf\_MAT1 zastupljeniji je kod hrvatskih izolata (66,7%), dok većina belgijskih izolata pripada idiomorfu Hf\_MAT2 (86,7%). Molekularna genetska analiza RAMS markerima utvrdila je dvije populacije izolata, koje nisu povezane s geografskim podrijetlom izolata (Hrvatska, Belgija). Mala učestalost mitovirusa HfMV1 kod hrvatskih izolata može predstavljati razlog povećane virulentnosti samoga patogena, te njihove brže stope rasta pri optimalnim temperaturama.
8. Ekstrakti lišća jasena u hranidbenoj podlozi djeluju pozitivno na rast gljivičnog micelija *H. fraxineus*. Najbrži rast izolata *H. fraxineus* zabilježen je na agaru obogaćenom ekstraktima lišća običnog jasena, zatim na agaru s ekstraktom lišća crnog jasena, te najsporiji rast izolata utvrđen je na agaru s ekstraktima lišća poljskog jasena.
9. Djelovanje UVB i UVA spektra svjetlosti reducira rast i sporulaciju gljive međutim ne rezultira mortalitetom izolata *in vitro*. Kontinuiranom izlaganju vidljivom spektru svjetlosti u gljive *H. fraxineus* je zabilježena pojačana reprodukcija.
10. Primjenom Allicin sredstva zaštite bilja možemo značajno reducirati rast patogena *in vitro*. Kod izolata kod kojih je djelovanje Allicin sredstva bilo uspješnije (nakon tretiranja izolati su prestali rasti u razdoblju trajanja pokusa) fruktifikacija je također bila minimalna ili je izostala. Kod izolata gdje je Allicin sredstvo bilo manje uspješno prilikom tretiranja (izolati su nastavili svoj rast u smanjenom obujmu) vidljiva je fruktifikacijska hiperprodukcija jer su izolati fruktificirali od 6,54-8,45 puta više od istih izolata u kontrolnoj grupi.
11. Temperatura ima direktan utjecaj na rast i razvoj nekroza u prirodi koje uzrokuje patogen *H. fraxineus*. Konstantna temperatura od 23 °C povoljnije djeluje na rast nekroza od varijabilnih temperatura. Dokazan je i utjecaj domaćina na rast nekroza što

može biti posljedica različite osjetljivosti genotipova sadnica ili bolje prilagodbe izolata *H. fraxineus* na obični jasen.

12. Niti jedan od testiranih klonova nije ukazao na totalnu rezistentnost prema patogenu, međutim dokazana je reducirana osjetljivost ili tolerantnost kod klonova BJ25, BJ38, NG03 i NG31. Samo klonovi s malim duljinama nekroza i malim koeficijentom varijacije se mogu razmatrati za testove potomstva. Više genotipova poljskog jasena treba testirati za prvu selekciju, tako da najosjetljivije jedinke mogu biti izuzete iz sjemenskih plantaža zbog svojih negativnih svojstava u osjetljivosti na patogena *H. fraxineus*.
13. Utvrđeno je povećanje vrijednosti kalija i cinka kod umjetno zaraženih (inokuliranih) sadnica poljskog jasena, a smanjene vrijednosti željeza. Poljski jasen usljed djelovanja patogena akumulira biogene elemente u list. Ugljik je jedini element koji je pokazao statističku značajnu negativnu korelaciju s duljinama nekroza zaraženih klonova. Najtolerantniji klonovi na infekciju patogenom iz testova osjetljivosti pokazuju smanjene vrijednosti mangana, a povećane vrijednosti cinka. Razlike u akumulaciji biogenih elemenata mogu biti posljedica varijabilnosti genotipova klonova (domaćina), genotipova gljive (patogena), vremena uzorkovanja, te dostupnosti hraniva iz tla.
14. Klonovi su klasirani u rane i kasne fenološke grupe s obzirom na početak listanja, ali i na odbacivanje lista u jesen. Klon NG03 pripada grupi ranih fenotipova listanja i pokazuje tendenciju smanjene osjetljivosti. Potencijalno dobar klon za nastavak istraživanja osjetljivosti na patogena *H. fraxineus* s obzirom na fenologiju je klon NG31 koji ima kraći vegetacijski period i smanjenu prosječnu duljinu razvijenih nekroza u kori.
15. Pojava hipovirulentnosti kod patogena *H. fraxineus* nije dokazana. Postoji redukcija nekrotičnih lezija na običnom jasenu s izolatima koji sadrže mitovirus HfMV1. Rezultati redukcije nekroza s virusnim izolatima na poljskom jasenu nisu konzistentni.
16. U *in vivo* testiranjima injektiranjem Allicin sredstava zaštite u sadnice poljskog jasena utvrđena je redukcija u rastu nekroza. Nekroze nakon tretiranja stagniraju u rastu prema gore, dok nastavljaju rast prema bazi stabljike. Nemoguće je tretirati ili suzbiti patogena u nekrotičnom dijelu biljke, no moguće je zaustaviti ili usporiti daljnju progresiju nekrotičnih lezija.

## 6. PRILOZI SLIKE

### DNA extraction from mycelium with the NucleoSpin Plant II kit (250 reactions)

#### (Machery-Nagel)

##### 1. Preparation of working solutions

##### Wash buffer PW2:

**250 reactions:** add 200 ml ethanol and mark the label of the bottle

**50 reactions:** add 100 ml ethanol and mark the label of the bottle

##### RNase A:

**250 reactions:** add 1.5 ml sterile water

**50 reactions:** add 600 µl sterile water

Attention, after preparation, the RNase A solution must be stored at -20°C (up to 1 year). In order to avoid successive thaws, the RNase solution should be divided into small aliquots.


##### 2. DNA extraction

1. Put a thermostatic bath at 65°C and preheat Elution buffer PE to 65°C
2. Collect the mycelium in a 1.5 ml tube add 200 µl buffer PL1 and homogenize the sample using a micro pistil and vortex regularly. Add additional 200 µl buffer PL1 and continue to homogenize the sample (=> 400 µl buffer PL1 at the end of this step)
3. Add 10 µl RNase A solution and mix sample thoroughly
4. Incubate for 30 min at 65°C
5. Place a Nucleospin filter (violet ring) into a collection tube and load the lysate onto the column
6. Centrifuge for 2 min at 11000 g, collect the flow-through in a new 1.5 ml tube and discard the Nucleospin filter
7. Add 450 µl Buffer PC and mix thoroughly by vortexing
8. Place a NucleoSpin Plant II Column (green ring) into a new collection tube (2 ml) and load a maximum of 700 µl of the sample
9. Centrifuge for 1 min at 11000 g and discard the flow-through
10. Repeat the loading step for higher sample volumes
11. Add 400 µl Buffer PW1 to the NucleoSpin Plant II Column
12. Centrifuge for 1 min at 11000 g and discard flow-through
13. Add 700 µl Buffer PW2 to the NucleoSpin Plant Column II.
14. Centrifuge for 1 min at 11000 g and discard flow-through
15. Add another 200 µl Buffer PW2 to the NucleoSpin Plant II Column
16. Centrifuge for 2 min at 11000 g in order to remove wash buffer and dry the silica membrane
17. Place the NucleoSpin Plant II Column into a new 1.5 ml tube
18. Pipette 50 µl Buffer PE (65°C) onto the membrane
19. Incubate the Nucleospin Plant II Column for 5 min at 65°C
20. Centrifuge for 1 min at 11000 g to elute the DNA
21. Repeat steps 18 to 20 and store DNA in a new 1.5 ml tube at -20°C

Slika 80. Protokol za DNA ekstrakciju s NucleoSpin Plant II kit

Figure 80. Protocol for DNA extraction with NucleoSpin Plant II kit





DEPARTEMENT LUTTE BIOLOGIQUE ET RESSOURCES PHYTOGENETIQUES

*Suivi des échantillons d'un colis pour la détection de \_\_\_\_\_  
par PCR temps réel*

Numéro de contrat : ..... Numéro d'entrée du lot d'échantillons : .....

Respect des consignes de température

Température congélateur (-25°C / -15°C) de stockage des ADN : .....

Température congélateur (-25°C / -15°C) de stockage des réactifs PCR : .....

Température ambiante (+15-35°C) : .....

Préparation du mélange réactionnel pour la PCR

Nombre de réactions préparées : .....

Réactif	n°entrée	Date d'expiration		1 rxt	vol final
		Sol. Mère	Sol. Fille		
PCR Core Kit 10x		/ /	/ /	2	
MgCl2 50 mM				2	
dNTPs 5 mM				0.8	
Amorce 1 (conc' ....)		/ /	/ /	1	
Amorce 2 (conc' ....)		/ /	/ /	1	
Sonde		/ /	/ /	1	
Eau mQ				7.05	
HotGoldStar Taq				0.15	
<b>Total</b>				<b>15</b>	

+ 5 µl ADN

Organisation des échantillons sur la plaque 96 puits du thermocycleur T<sub>m</sub> = 60°C, 40 cycles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Légende :**  
 - E1 : Premier échantillon, E2 : Second échantillon, E3 : Troisième échantillon, ...  
 a : Première extraction, b : seconde extraction. Te+ : Témoin positif de PCR (plasmide); T1 : témoin d'inhibition (ADN enrichi avec plasmide), B : blanco PCR (eau), Te- : témoin négatif d'extraction

E1 : .....; E2 : .....; E3 : .....; E4 : .....; E5 : .....  
 E6 : .....; E7 : .....; E8 : .....; E9 : .....; E10 : .....

Nom de l'opérateur : ..... Date : .....

Référence cahier de laboratoire : .....

Slika 81. Real Time qPCR protokolni obrazac

Figure 81. Real Time qPCR protocol form

## PCR pour l'identification des mating types de *Chalara fraxinea*

**1. Référence:** Gross et al. 2012, Fungal Genetics and Biology.

**2. Principe:**  
Deux mating types existent chez *C. fraxinea* (Mat1 et MAT2). Ces phénotypes sont portés par des gènes différents. En utilisant 2 jeux d'amorces dans une seule PCR (multiplex PCR), on va amplifier soit une portion du gène MAT1, soit une portion du gène MAT2 et par conséquent identifier le mating type de l'isolat. Si les deux portions sont amplifiées, cela signifie que les 2 mating types sont présents dans l'échantillon.

**3. Amorces PCR:**

Set 1:  
HP\_MAT1F: 5' tcc ttc gaa ccc aaa cac ct 3'  
HP\_MAT1R: 5' gca tat cat cgg ctg cct tg 3'

Set 2:  
CF\_HMG\_F: 5' cgc ttt cag gta tgt tat ta 3'  
CF\_HMG\_R: 5' tga tac tgg tag ttc gga ta 3'

**4. Mix PCR**

Tampon 10x	2
MgCL2 50 mM	0.5
dNTPs 10 mM	0.5
HP_MAT1F (5 µM)	1
HP_MAT1R (5 µM)	1
CF_HMG_F (5 µM)	1
CF_HMG_R (5 µM)	1
Eau mQ	7.8 µl
Taq DNA pol (5 u/µl)	0.2
ADN	5
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

**5. Protocole thermique**

94°C, 3 min

94°C, 30 sec

55°C, 30 sec

72°C, 30 sec

72°C, 5 min

35X

**6. Electrophorèse**

Gel 1.5%

Produit des amorces HP\_MAT1 : **1207 pb** ; Produit des amorces CF\_HMG : **571 pb**

Slika 82. Protokol određivanja idiomorfa izolata gljive *H. fraxineus*

Figure 82. Protocol for determination of *H. fraxineus* mating types



### Protocol for the analysis of *Hymenoscyphus fraxineus* DNA with RAMS primers

(from Kraj et al; 2012)

1. Primer sequences (mother solution at 100 µM)

Kraj-CGA: 5' DHBCGACGACGACGACGA 3'	annealing temperature: 59°C
Kraj-ATG: 5' DHBATGATGATGATGATG 3'	annealing temperature: 46°C
Kraj-AGC: 5' DHBAGCAGCAGCAGCAGC 3'	annealing temperature: 59°C
Kraj-ACA: 5' BDBACAACAACAACAACA 3'	annealing temperature: 49°C

2. Preparation of primer solutions at 20 µM

Dilute 60 µl of mother solution (at 100 µM) in 240 µl sterile water and distribute the solution into two 1.5 ml tubes (storage at -20°C)

3. PCR mix (total volume = 25 µl)

PCR buffer 10X	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.7 µl (1.4 mM in the PCR reaction)
dNTPs 10 mM	0.5 µl (200 mM in the PCR reaction)
Primer 20 µM*	1.25 µl
Sterile water	18 µl
Taq DNA pol (5 u/µl)	0.05 µl (0.25 U in the PCR reaction)
DNA	2 µl**

\*Kraj-CGA or Kraj-ATG or Kraj-AGC or Kraj-ACA

\*\* solution at 1 ng/µl

4. Amplification reaction

95°C, 5 min; 36x [95°C, 1 min; annealing, 45 sec\*; 72°C, 2.5 min]; 72°C, 8 min

Attention:

CGA and AGC on Perkin Elmer

ATG and ACA on Biorad

\*See point 1

5. Electrophoresis

1.5% agarose gel, 100 bp DNA ladder (9 µl)

100 mA

Minimum 6 hours of migration!

Slika 83. Protokol genetičke analize s RAMS bazama početnicama

Figure 83. Protocol of genetic analysis with RAMS primers



## Protocol for the detection of virus HfMV1 in *Hymenoscyphus fraxineus*

From Schobel et al. 2014

### Recommendations to avoid RNase contamination:

- Use sterilized tubes and new boxes of tips (dedicated to RNA extraction)
- Use micro-pestles decontaminated by a treatment in bleach 0.2° for minimum 2 h (bleach at 8° diluted 40x => 10 ml bleach at 8° + 390 ml water)
- Wear gloves when handling RNA and all reagents and change gloves frequently
- Keep the kit components tightly sealed when not in use
- Keep all tubes tightly closed during the reverse transcription reaction

### 1. RNA extraction (Kit NORGEN Plant/Fungi Total RNA Purification Kit) : ~ 1h

1. Mycelium grown on malt extract agar plate for 4-5 weeks in the dark at 20-22°C
2. Turn on the dry bath (55°C)
3. Prepare a working solution of the Wash Solution A (add 90 ml ethanol => final volume=128 ml) and a bottle with ethanol 96-99%
4. Collect the mycelium in a 1.5 sterilized tube **on ice** and add 600 µl Lysis buffer C => grind with sterilized micro-pestle and incubate at 55°C for 5 min (occasionally, mix the lysate by inverting the tube)
5. Assemble a filter column (clear O-ring) with one of the provided collection tube (tube 1) and pipette the lysate into filter column
6. Centrifuge for 2 min at 14000 g
7. Transfer only the clear supernatant from the flow-through into a sterilized 1.5 ml tube
8. Add an equal volume of **ethanol** and vortex to mix
9. Assemble a **spin column (grey O-ring)** with one of the provided collection tube (tube 2)
10. Apply up to 600 µl of the clarified lysate with ethanol onto the column and centrifuge for 1 min at 3500 g.
11. Discard the flow-through and reassemble the spin column with the collection tube (dried on a paper)
12. Steps 10-11 with the remaining lysate
13. Apply 400 µl of wash solution A to the column and centrifuge for 1 min at 14000 g – Ensure that entire wash solution has passed through into the collection tube (if not, spin for an additional minute)
14. Discard the flow-through and reassemble the spin column with its collection tube
15. Repeat steps 13/14 twice (3 washing steps)
16. Spin for 2 min at 14000 g in order to thoroughly dry the resin. Discard the collection tube
17. Place the column into a fresh **1.7 ml tube** provided with the kit
18. Add 50 µl of **Elution buffer** to the column
19. Centrifuge for 2 min at 200 g (~2000 rpm) followed by a 1 min spin at 14000 g. Note the volume eluted from the column. If the entire volume has not been eluted, spin the column at maximum speed for 1 additional minute
20. Store the RNA sample at -20°C for a few days (at -80°C for long term storage).

Slika 84. Protokol RNA ekstrakcije za detekciju HfMV1

Figure 84. RNA extraction protocol for the detection of HfMV1

## **2. cDNA synthesis (Thermo Scientific Maxima first strand cDNA synthesis kit for TR-qPCR with dsDNase) - ~ 30 min**

**Note:** Perform a RT-minus negative control reaction (which includes all components for RT-PCR except the Maxima H Minus Enzyme Mix) to assess for genomic DNA contamination of the RNA sample. WEAR GLOVES!

1. Preheat thermomixer at 37°C and a water bath at 85°C
2. After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store **on ice**.
3. Add the following reagents into a sterile 1.5 ml tube on ice (use a specific rack):

10X dsDNase Buffer	1 µl
dsDNase	1 µl
Template RNA	1.5 µl
Water (nuclease free)	6.5 µl

**Total= 10 µl**

4. Mix gently and centrifuge
5. Incubate for 2 min at 37°C
6. Chill on ice, briefly centrifuge and place on ice
7. Preheat thermomixer at 50°C
8. Add the following components to the same tube:

5X reaction mix	4 µl
Maxima Enzyme mix	2 µl
Water, nuclease free	4 µl

**Total=20 µl**

9. Mix gently and centrifuge
10. Incubate for 10 min at room temperature (It should be ~ 23-25°C) followed by **30 min at 50°C**
11. Terminate the reaction by heating at **85°C for 5 min**
12. Briefly centrifuge
13. The cDNA can be used directly for PCR or stored at -20°C for up to one week (for longer storage, -80°C is recommended). Attention: **Avoid free/thaw cycles of the cDNA !**

Slika 85. Protokol sinteze cDNA za detekciju HfMV1

Figure 85. Protocole for cDNA synthesis for the detection of HfMV1



### 3. PCR (primers developed by Schoebel et al. for the detection of the virus)

- PCR n°1 (used as a control of RNA extraction)
  - Primers CfAct\_90\_F and CfAct\_350\_R
- PCR n°2 (for the detection of virus HfMV1)
  - Primers Cf4-F1 and Cf4-R3
- PCR mix (total volume = 20 µl)
  - PCR buffer 10x      2 µl
  - MgCl<sub>2</sub> 50 mM      0.5 µl
  - dNTPs 10 mM      0.5 µl
  - Primer 1 (5 µM)    2 µl
  - Primer 2 (5 µM)    2 µl
  - Sterile water      11.8 µl
  - Taq DNA Pol      0.2 µl
  - DNA                1 µl
- Amplification reaction (the same for both sets of primers)  
94°C, 2 min; 33x [94°C, 1 min; 55°C, 1 min 30 sec; 72°C, 2 min]; 72°C, 8 min

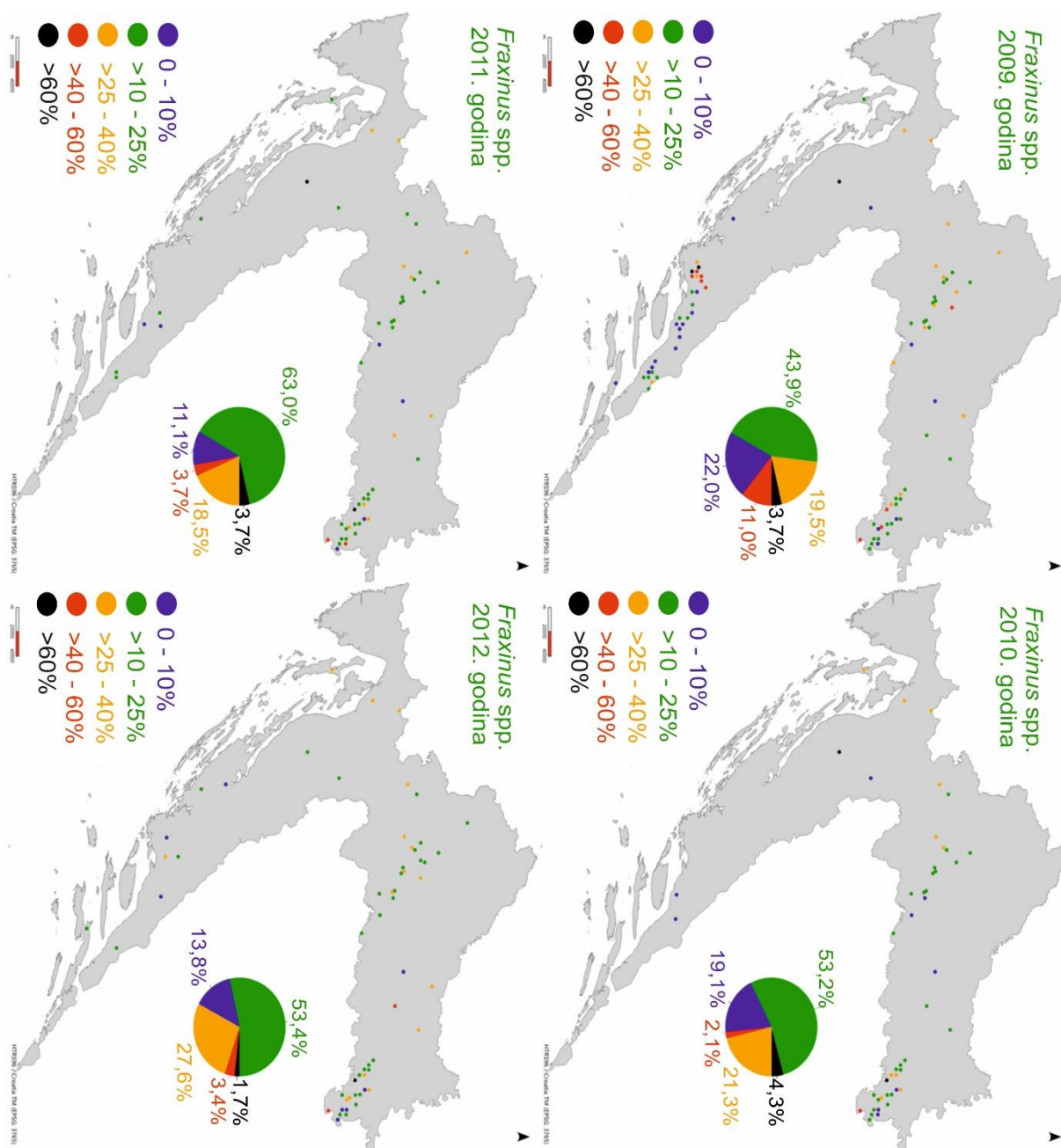
### 21. Electrophoresis

Agarose gel 1.5 %

Sample positive => amplification signal for the control (300 bp) and for the virus (511 bp)

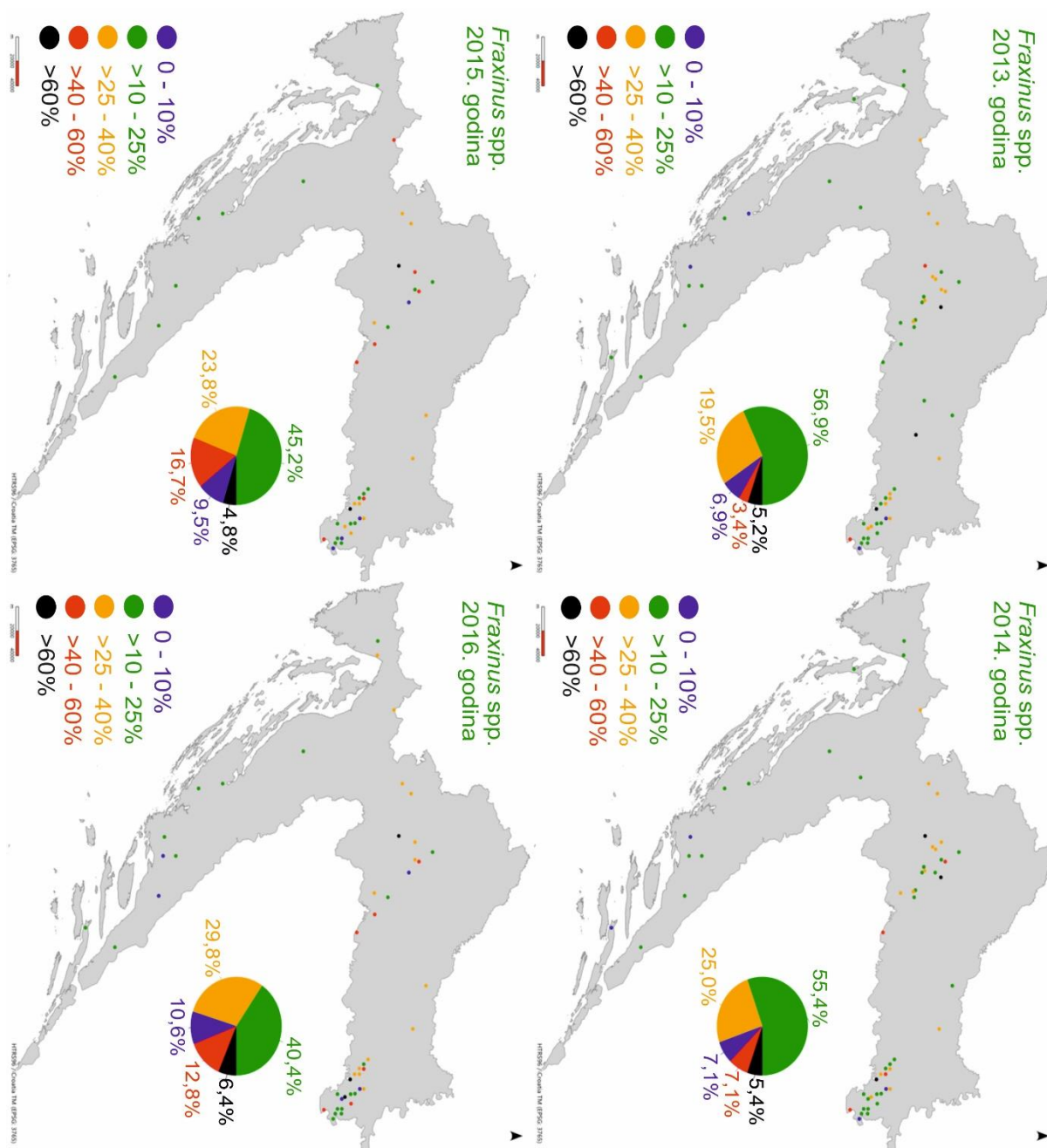
Slika 86. Protokol PCR amplifikacije za detekciju HfMV1

Figure 86. PCR amplification protocole for the detection of HfMV1



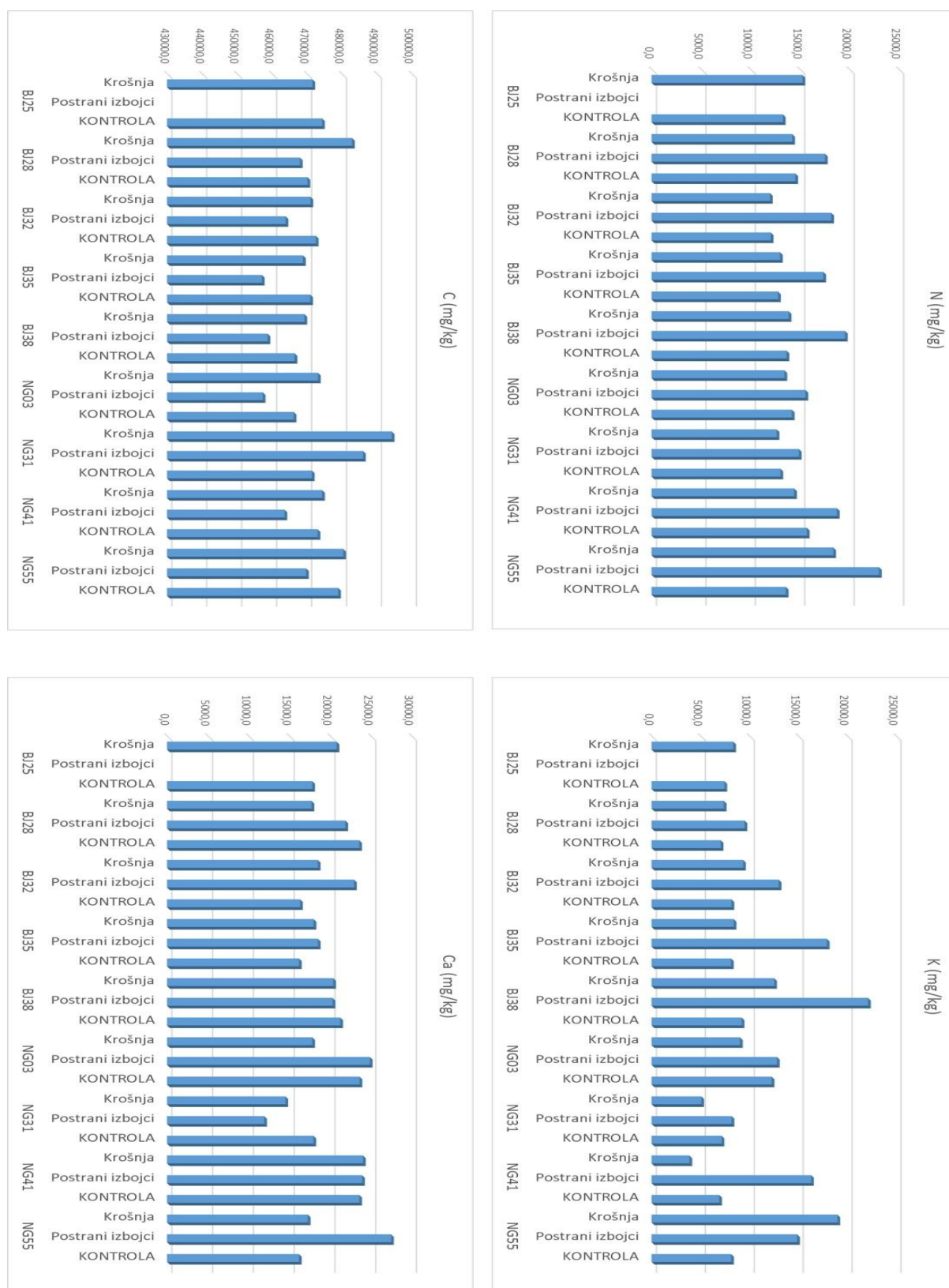
Slika 87. Procjena osutosti krošnje stabala *Fraxinus* spp. u razdoblju od 2009. – 2012. godine ([www.icp.sumins.hr](http://www.icp.sumins.hr))

Figure 87. Defoliation assessment of *Fraxinus* spp. trees in the period from 2009 – 2012 ([www.icp.sumins.hr](http://www.icp.sumins.hr))



Slika 88. Procjena osutosti krošnje stabala *Fraxinus* spp. u razdoblju od 2013. – 2016. godine ([www.icp.sumins.hr](http://www.icp.sumins.hr))

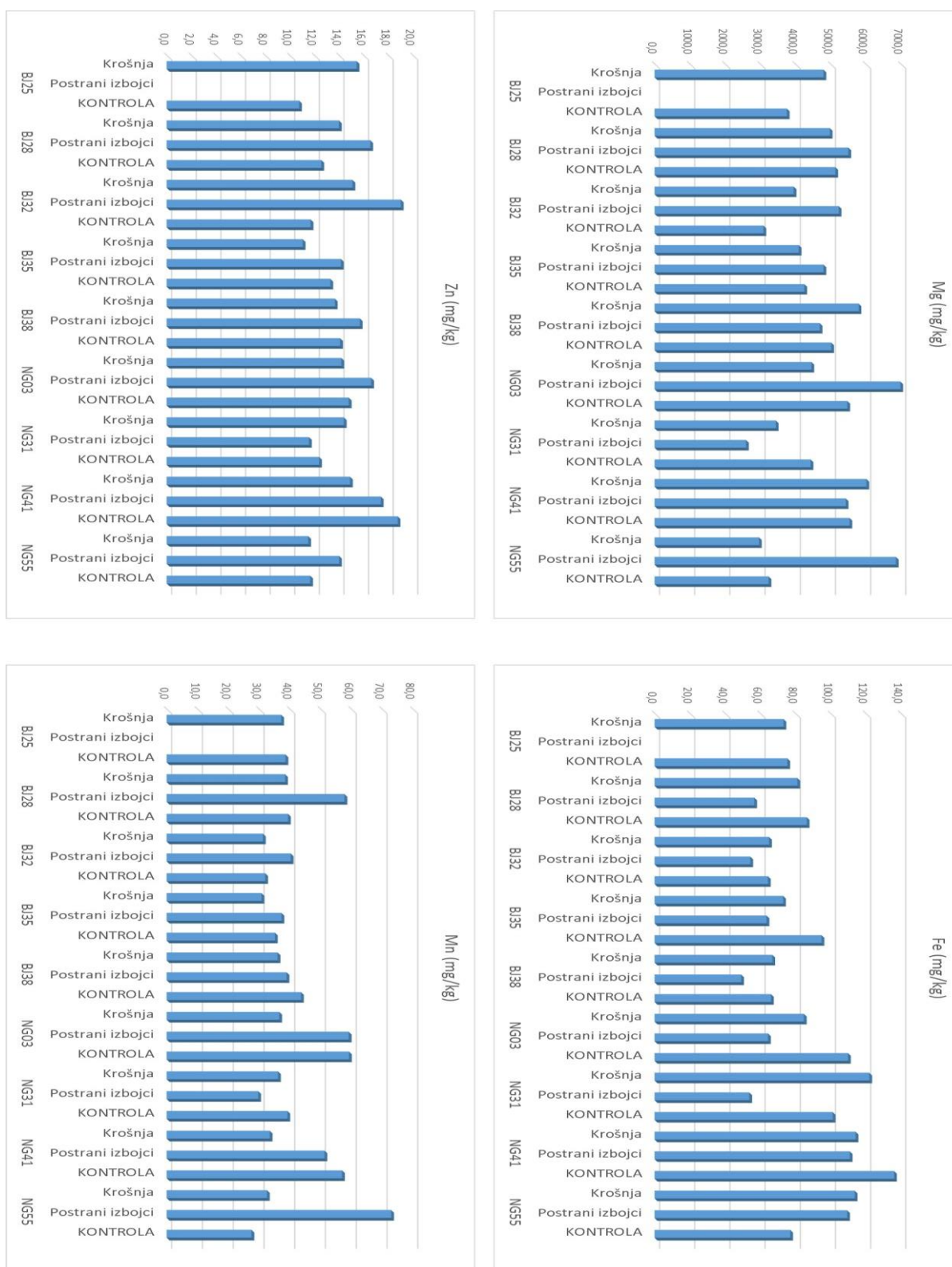
Figure 88. Defoliation assessment of *Fraxinus* spp. trees in the period from 2013 – 2016 ([www.icp.sumins.hr](http://www.icp.sumins.hr))



Slika 89. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (1/3)

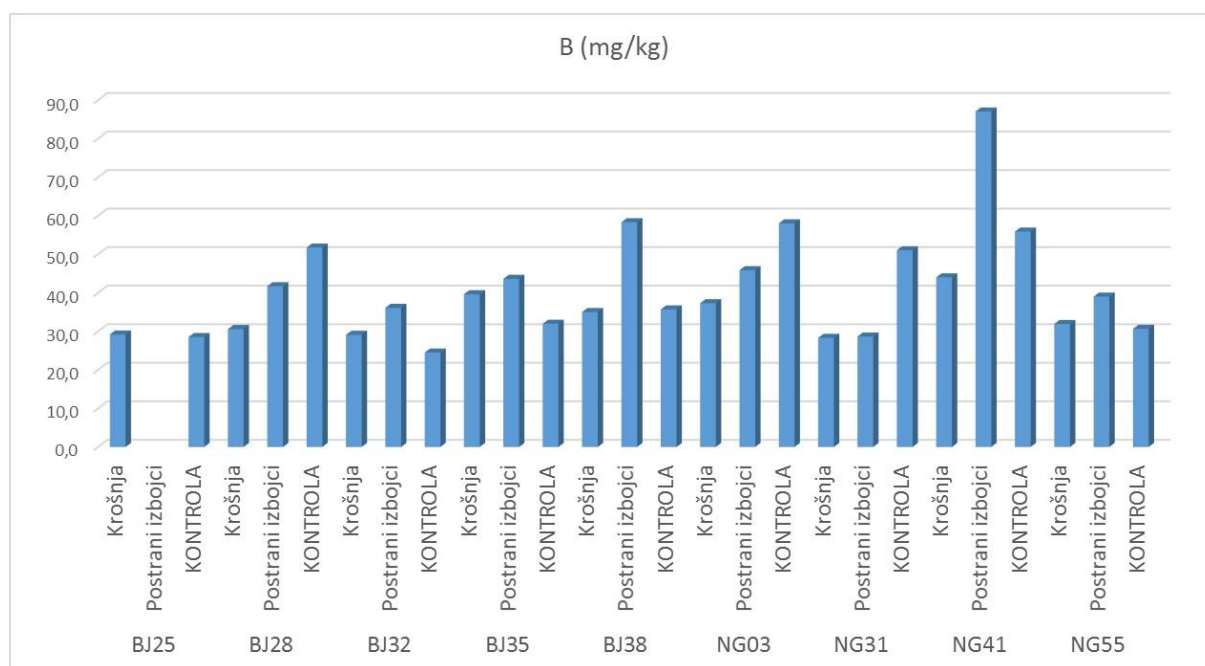
Figure 89. Average concentration of leaf nutrition chemical elements according to the collection method used (1/3)





Slika 90. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (2/3)

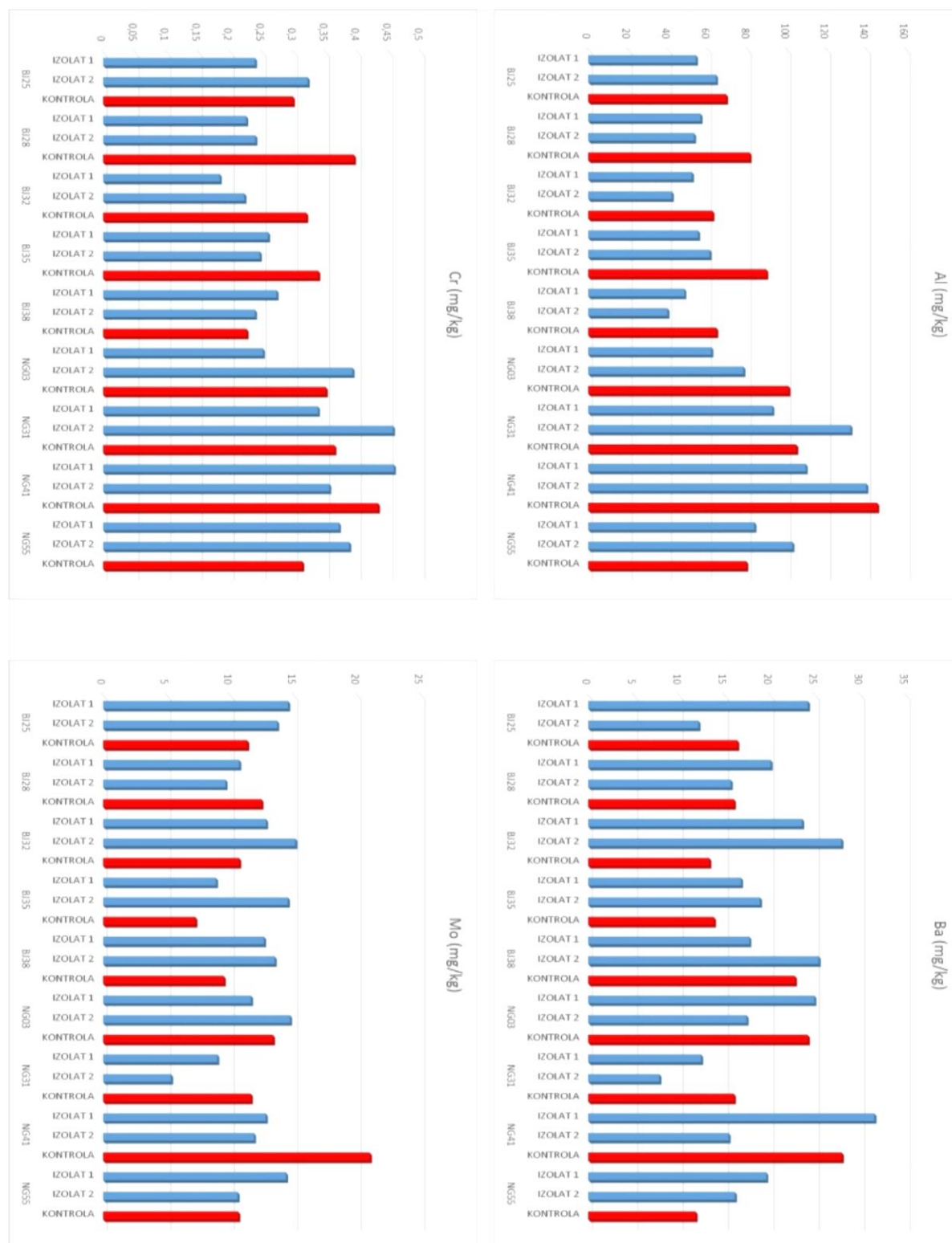
Figure 90. Average concentration of leaf nutrition chemical elements according to the collection method used (2/3)



Slika 91. Prosjek koncentracija kemijskih elemenata ishrane lista prema načinu sakupljanja uzoraka (3/3)

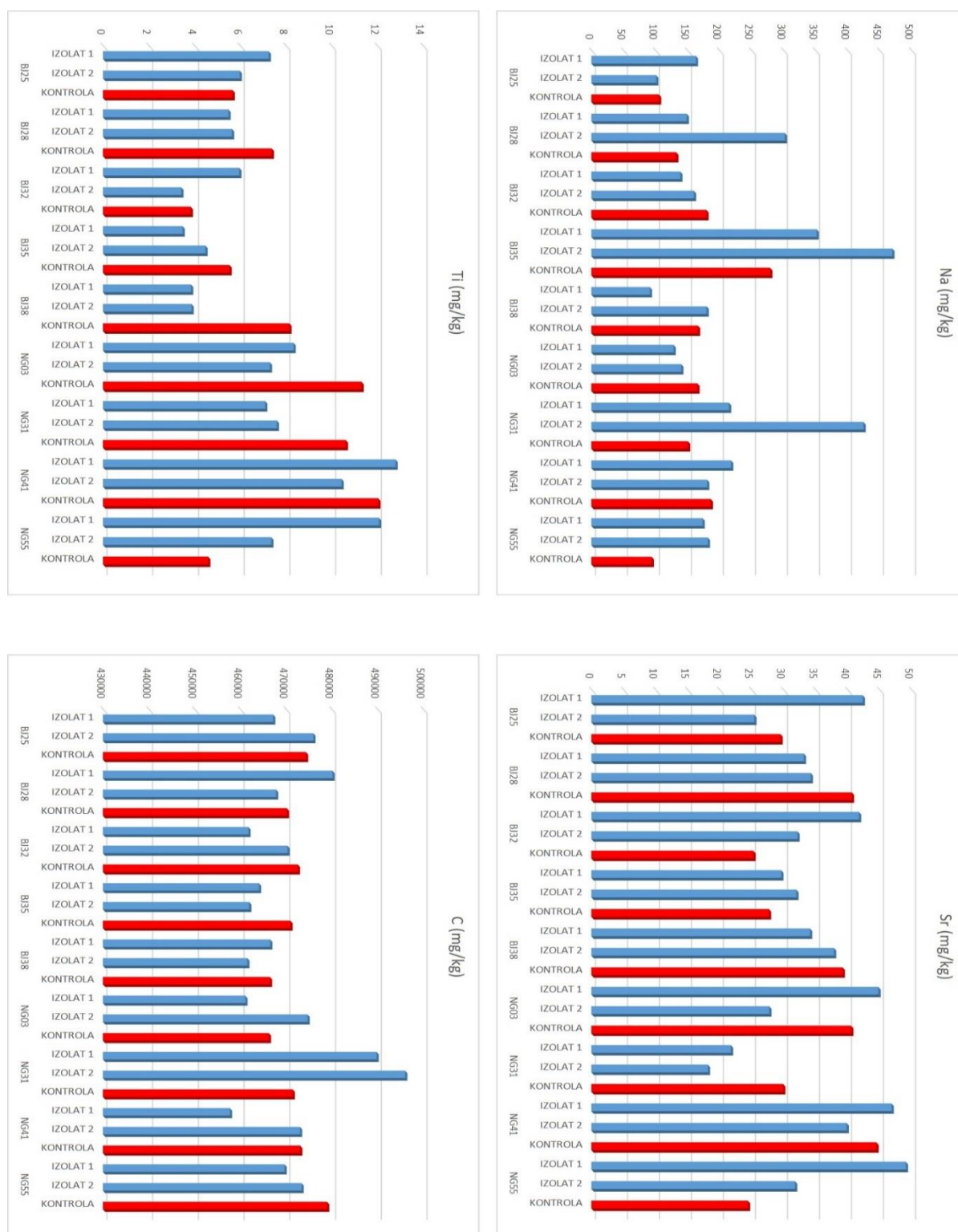
Figure 91. Average concentration of leaf nutrition chemical elements according to the collection method used (3/3)





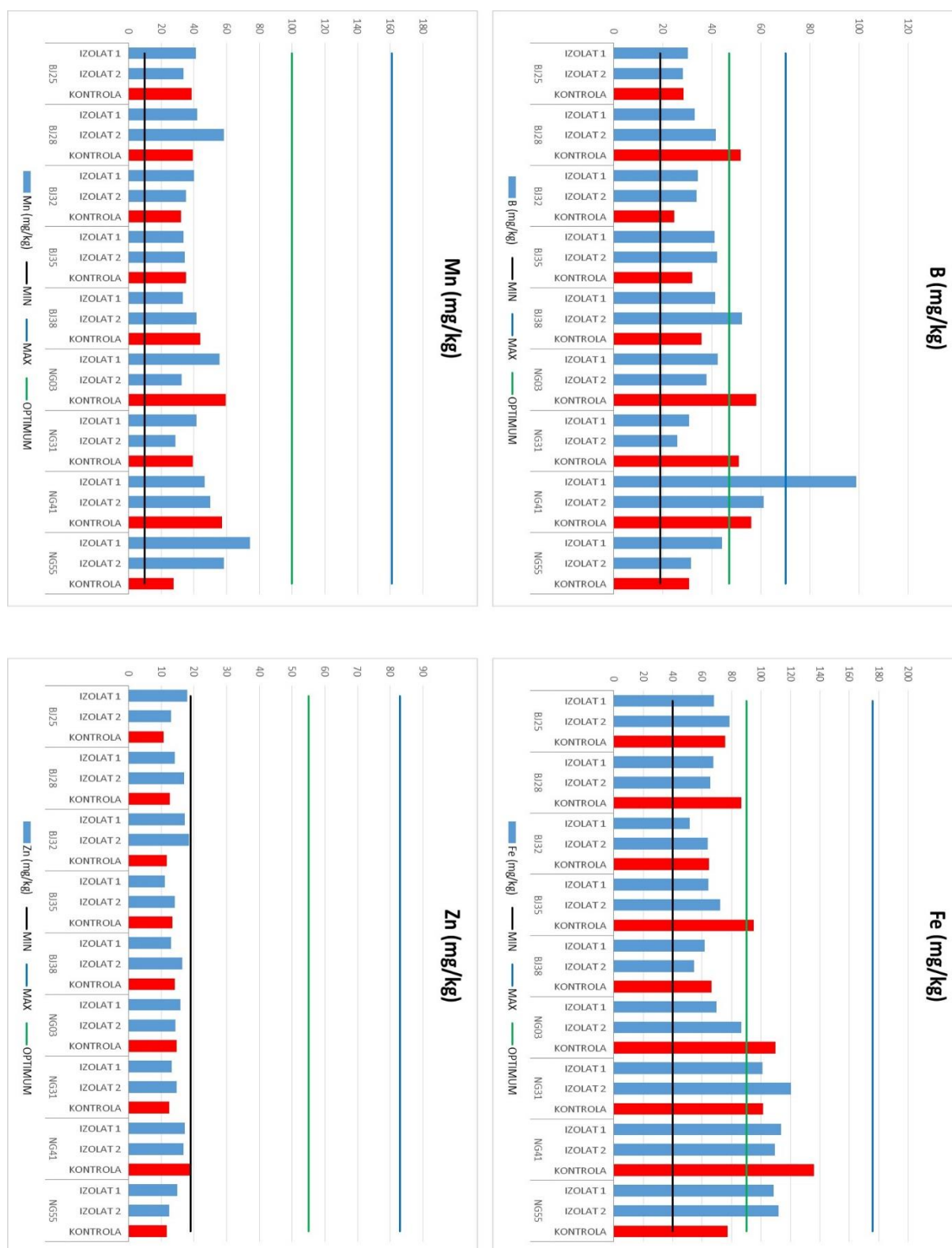
Slika 92. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom *H. fraxineus* s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (1/4)

Figure 92. Average values of mineral nutrient concentrations in the leaves of narrow-leaved ash clones 12 months after the infection with the pathogen *H. fraxineus* with two different isolates, control group (I0) is not infected with the pathogen (1/4)



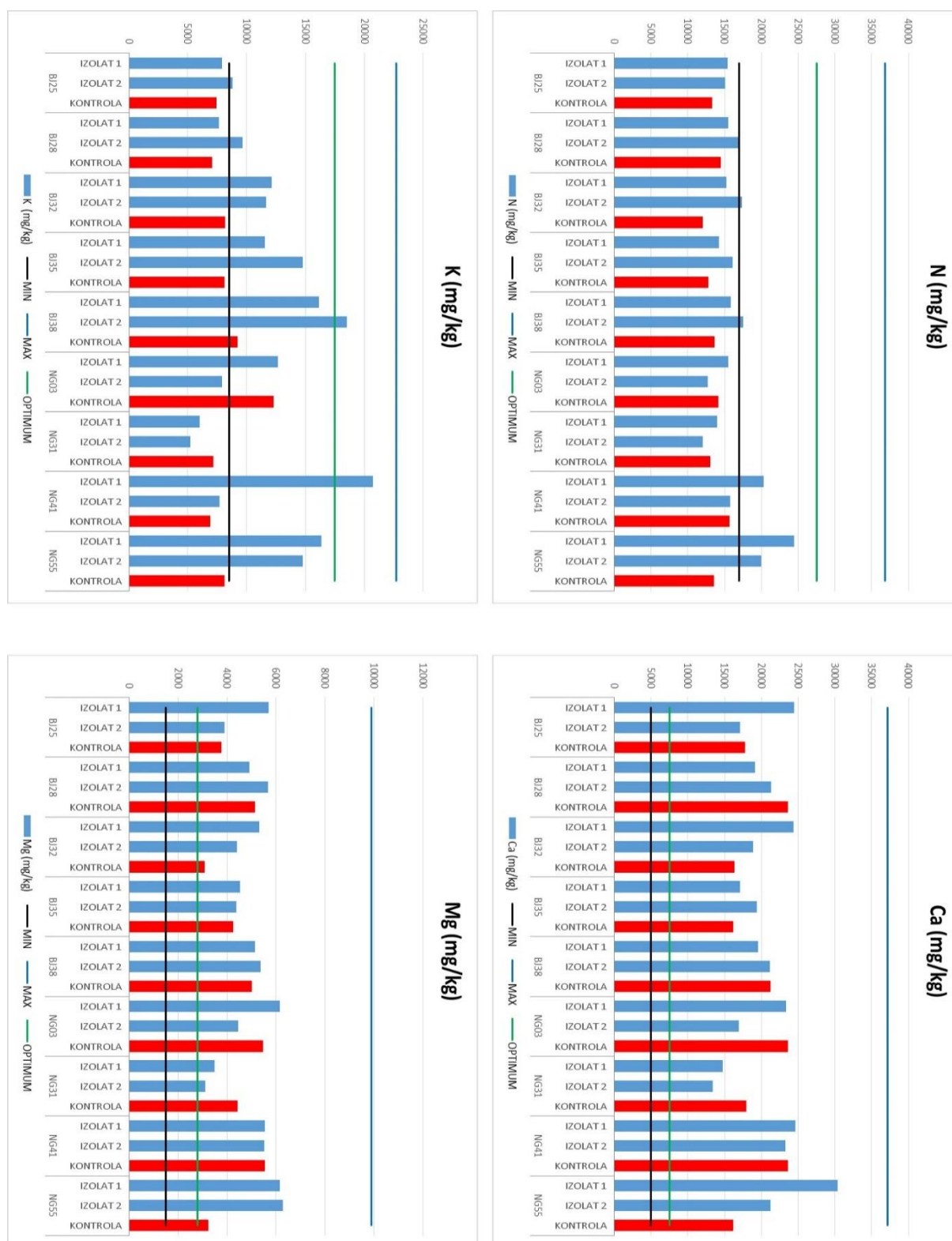
Slika 93. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jaseana 12 mjeseci nakon infekcije patogenom *H. fraxineus* s dva različita izolata, kontrolna skupina (I0) nije inficirana patogenom (2/4)

Figure 93. Average values of mineral nutrient concentrations in the leaves of narrow-leaved ash clones 12 months after the infection with the pathogen *H. fraxineus* with two different isolates, control group (I0) is not infected with the pathogen (2/4)



Slika 94. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom *H. fraxineus* s dva različita izolata, kontrolna skupina (10) nije inficirana patogenom (3/4)

Figure 94. Average values of mineral nutrient concentrations in the leaves of narrow-leaved ash clones 12 months after the infection with the pathogen *H. fraxineus* with two different isolates, control group (10) is not infected with the pathogen (3/4)



Slika 95. Prosječne vrijednosti koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova poljskog jasena 12 mjeseci nakon infekcije patogenom *H. fraxineus* s dva različita izolata, kontrolna skupina (10) nije inficirana patogenom (4/4)

Figure 95. Average values of mineral nutrient concentrations in the leaves of narrow-leaved ash clones 12 months after the infection with the pathogen *H. fraxineus* with two different isolates, control group (10) is not infected with the pathogen (4/4)



## 7. PRILOZI TABLICE

Tablica 39. Parametri instrumentalne analize

Table 39. Parameters of instrumental analysis

Parametar	Vrijednost		
Instrument	Thermo Fischer iCAP6300 Duo		
Snaga RF-a	1150 W		
Protok rashladnog plina	12 L/min		
Protok plina za uzorak	0,65 L/min		
Protok pomoćnog plina	0,5 L/min		
Sustav za uvođenje uzorka	–automatski uzorkivač CETAC ASX-260 –koncentrični raspršivač s vrtložnom komorom za raspršivanje		
Brzina peristaltičke pumpe	45 okr/min		
Cijevčice peristaltičke pumpe	–uzorak: narančasto-bijela –ispiranje: bijelo-bijela		
Vrijeme uvođenja uzorka	45 s		
Vrijeme ispiranja	60 s		
Analiza plazme ( <i>Plasma view</i> )	Automatska ( <i>Auto View</i> )		
Maksimalno vrijeme mjerenja	–niske valne duljine (160-230 nm): 15 s –visoke valne duljine (230-847 nm): 5 s		
Mjereni elementi i valne duljine (nm)	Al – 167,079 As – 189,042 B – 208,959 Ba – 455,403 Be – 234,861 Ca – 393,366 Cd – 228,802 Co – 228,616 Cr – 205,552	Cu – 324,754 Fe – 238,204 K – 766,490 Mg – 279,553 Mn – 257,610 Mo – 202,030 Na – 589,592 Ni – 231,604 Pb – 220,353	Sb – 206,833 Se – 196,090 Sr – 407,771 Ti – 334,941 Tl – 190,856 Zn – 213,856
Kalibracijske otopine	– 0 µg L <sup>-1</sup> (svi elementi) – 1 µg L <sup>-1</sup> (svi elementi, osim Na, K, Mg i Ca) – 10 µg L <sup>-1</sup> (svi elementi, osim Na, K, Mg i Ca) – 100 µg L <sup>-1</sup> (svi elementi, osim Na, K, Mg i Ca) – 1000 µg L <sup>-1</sup> Na, 200 µg L <sup>-1</sup> K, 400 µg L <sup>-1</sup> Mg, 2000 µg L <sup>-1</sup> Ca		
Otopina za ispiranje sustava	Dušična kiselina, HNO <sub>3</sub> , <i>supra pur</i> , 1 % (v/v)		

Tablica 40. Pozitivne lokacije prisutnosti gljive *H. fraxineus* u razdoblju 2013. – 2016. godine 1/2

Table 40. Positive locations of fungus *H. fraxineus* presence in the period from 2013 – 2016 1/2

TABLICA SVEUKUPNIH POZITIVNIH LOKACIJA SAKUPljanja UZORAKA <i>H. fraxineus</i>					
Broj uzorka	LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Kod tla; Tip tla	Nadmorska visina
1	G.J. Vrbanske šume - Sočna 278 Vrbanja	44.989327	18.861422	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	78
2		44.989231	18.861634	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	74
3		44.988933	18.861615	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	70
4	G.J. Vrbanske šume - 918 Vrbanja	45.034364	18.980042	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	80
5		45.032798	18.981058	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	80
6		45.035301	18.983154	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	80
7	G.J. Vrbanske šume 132a Vrbanja	45.009360	18.976098	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	80
8		45.006386	18.973662	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	81
9		45.008820	18.978014	42 - Ritska crnica djelomično hidromeliorirana	82
10	G.J. Kusare 49a Županja	45.092314	18.784470	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	92
11		45.095917	18.789211	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	94
12		45.093856	18.792484	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	92
13	G.J. Kragujna - Poloj 708 Županja	45.005410	18.748070	5 - Aluvijalno (fluvio) obranjeno od poplava	88
14		45.005131	18.748192	5 - Aluvijalno (fluvio) obranjeno od poplava	88
15		45.004935	18.748070	5 - Aluvijalno (fluvio) obranjeno od poplava	91
16	G.J. Vrapčana - 1 Vinkovci	45.261182	18.827676	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	66
17		45.261234	18.827824	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	66
18		45.260951	18.827575	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	64
19	G.J. Ključevi - 23C Nova Gradiška	45.166199	17.355093	3 - Eutrično smeđe	86
20		45.166128	17.355145	3 - Eutrično smeđe	84
21		45.166251	17.355077	3 - Eutrično smeđe	88
22	G.J. Gradiška brda - 68 Klonska sjemenska plantaža Nova Gradiška HR FAN SP 122/301	45.252187	17.361800	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	112
23		45.252200	17.361963	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	112
24		45.253107	17.362052	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	112
25	G.J. Grede Kamare - 398 Jasenovac	45.259467	17.048345	65 - Močvarno glejno vertično	86
26		45.259688	17.048492	65 - Močvarno glejno vertično	86
27		45.259472	17.048492	65 - Močvarno glejno vertično	88
28	G.J. Grede Kamare - 42C Jasenovac	45.258206	17.050951	65 - Močvarno glejno vertično	86
29		45.255115	17.051017	65 - Močvarno glejno vertično	88
30		45.255735	17.046678	65 - Močvarno glejno vertično	87
31	G.J. Josip Kozarac - 56A Lipovljani	45.419835	16.804094	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	93
32		45.422345	16.802255	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	94
33		45.423348	16.805926	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	94
34	G.J. Josip Kozarac - 72C Lipovljani	45.394961	16.787867	65 - Močvarno glejno vertično	95
35		45.392429	16.783058	65 - Močvarno glejno vertično	97
36		45.394479	16.788639	65 - Močvarno glejno vertično	97
37	G.J. Josip Kozarac - 71D Lipovljani	45.393063	16.780440	65 - Močvarno glejno vertično	107
38		45.393253	16.780456	65 - Močvarno glejno vertično	105
39		45.393177	16.780311	65 - Močvarno glejno vertično	106
40	G.J. Josip Kozarac - 199G Lipovljani	45.425077	16.822017	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	112
41		45.425043	16.822056	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	115
42		45.425127	16.822123	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	114
43	G.J. Čazmanske nizinske šume - 208 Čazma	45.707409	16.586785	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	87
44		45.707436	16.586727	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	105
45		45.707435	16.586717	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	105
46	Klonska sjemenska plantaža Čazma HR FAN SP 123/298	45.752674	16.583326	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	102
47		45.753378	16.582857	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	102
48		45.752746	16.582349	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliorirana	102
49	G.J. Česma 16a Čazma	45.836129	16.754763	65 - Močvarno glejno vertično	108
50		45.837707	16.754763	65 - Močvarno glejno vertično	106
51		45.838375	16.756135	65 - Močvarno glejno vertično	106
52	G.J. Turapoljski lug 87a	45.631344	16.191781	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	110
53		45.629900	16.194053	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	111
54		45.629038	16.191161	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	112
55	G.J. Turapoljski lug 80d	45.635301	16.156623	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	113
56		45.632599	16.155089	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	111
57		45.633800	16.158586	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	113
58	G.J. Belčićev gaj 53; 54 Odransko polje	45.530381	16.314064	65 - Močvarno glejno vertično	97
59		45.531678	16.315070	65 - Močvarno glejno vertično	97
60		45.534697	16.319244	65 - Močvarno glejno vertično	102
61	G.J. Sunja posavske šume 94a; 15a	45.321393	16.697979	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	96
62		45.325010	16.699190	65 - Močvarno glejno vertično	96
63		45.297718	16.721217	47 - Pseudoglej - glej, djelomično hidromeliorirani	100
64	G.J. Jastrebarski lugovi 29	45.630740	15.688074	65 - Močvarno glejno vertično	115
65		45.628958	15.689288	65 - Močvarno glejno vertično	115
66		45.630058	15.693660	65 - Močvarno glejno vertično	115

Legenda:

- poljski jasen
- obični jasen
- crni jasen

Tablica 41. Pozitivne lokacije prisutnosti gljive *H. fraxineus* u razdoblju 2013. – 2016. godine 2/2

Table 41. Positive locations of fungus *H. fraxineus* presence in the period from 2013 – 2016 2/2

TABLICA SVEUKUPNIH POZITIVNIH LOKACIJA SAKUPljanja UZORAKA <i>H. fraxineus</i>					
Broj uzorka	LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Kod tla; Tip tla	Nadmorska visina
67	Ivanšćica L1	46.179721	16.120705	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	983
68	Ivanšćica L3	46.182698	16.126570	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	1024
69	Ivanšćica L5	46.187402	16.108232	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	881
70	Park prirode Žumberak - Samoborsko gorje - Malinci	45.723232	15.343835	17 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	656
71		45.723247	15.343861	18 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	656
72		45.723318	15.344030	19 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	654
73	G.J. Goranska Dobra - 23A Vrbosko	45.394995	15.050652	24 - Kiselo smeđe na klastitima	387
74		45.394888	15.050631	25 - Kiselo smeđe na klastitima	387
75		45.394897	15.050492	26 - Kiselo smeđe na klastitima	387
76	G.J. Belevine - 11A, 10B Zalesina	45.383596	14.872510	25 - Smeđe na dolomitu	771
77		45.383509	14.873481	25 - Smeđe na dolomitu	781
78		45.382926	14.873513	25 - Smeđe na dolomitu	772
79	G.J. Petehovac - 22A DeInice	45.371741	14.781180	56 - Smeđe na vapnencu	704
80		45.371343	14.781120	56 - Smeđe na vapnencu	701
81		45.371269	14.780964	56 - Smeđe na vapnencu	703
82	Brinje - Pernari	45.012249	15.197498	57 - Smeđe na vapnencu	650
83		45.012613	15.197606	57 - Smeđe na vapnencu	650
84		45.012439	15.197323	57 - Smeđe na vapnencu	649
85	Brinje L2 Križopolje	45.026501	15.189707	57 - Smeđe na vapnencu	543
86	Brinje L3 Lipice	45.001524	15.251416	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	617
87	Brinje L4 Glibodol	44.999181	15.304540	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	536
88	Vratnik L1	44.974934	14.988289	58 - Smeđe na vapnencu	696
89	Vratnik L2	44.976650	14.985905	58 - Smeđe na vapnencu	678
90	Vratnik L3	44.983051	14.979168	49 - Rendzina na trošini vapnenca	662
91	Jablanac L1	44.715056	14.892225	57 - Smeđe na vapnencu	24
92	Jablanac L2	44.723228	14.897708	57 - Smeđe na vapnencu	10
93	Jablanac L3	44.724507	14.897423	57 - Smeđe na vapnencu	10
94	Lubenice L1	44.875056	14.344583	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	391
95	Lubenice L2	44.887144	14.331915	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	378
96	Lubenice L2	44.892526	14.327150	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	327
97	Gologorica L1	45.262802	14.027645	17 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	297
98	Gologorica L2	45.260706	14.035222	17 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	327
99	Gologorica L3	45.260936	14.041974	17 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	338
100	Oprtalj L1	45.383501	13.814938	31 - Antropogena flišnih i krških sinklinala i koluvija	379
101	Oprtalj L2	45.376522	13.819558	31 - Antropogena flišnih i krških sinklinala i koluvija	360
102	Oprtalj L3	45.373317	13.824686	31 - Antropogena flišnih i krških sinklinala i koluvija	371
103	Soulmes 1I	50.181176	4.737623		152
104	Soulmes 2I	50.194740	4.713733		200
105	Soulmes 3II	50.199408	4.742941		202
106	Nafraiture 1I ter	49.907281	4.900151		392
107	Nafraiture 3I	49.916362	4.891765		386
108	Nafraiture P	49.918326	4.928948		393
109	Gembloux N2	50.504478	4.674081		154
110	Gembloux 1III	50.532666	4.694169		165
111	Gembloux 7II	50.594333	4.782738		185
112	Chevetogne A	50.223330	5.085148		300
113	Chevetogne 4II	50.236354	5.133941		255
114	Heer 3II	50.168458	4.830210		169
115	Rulles 1IIF	49.741326	5.556740		411
116	Rulles 2IIPet	49.737420	5.585857		415
117	Florifoux 3I	50.463922	4.771629		177
118e	G.J. Ravna Gora 18a; 41a; 111; 132; 136 Ravna gora	45.326696	14.958607	56 - Smeđe na vapnencu	975
119e	G.J. Sjeverna Ivanšćica 12c Ivanec	46.208611	15.966716	43 - Močvarno glejna djelomično hidromeliiorirana	408
120e	G.J. Strahinjčica - Trnovac 1b; 1c Krapina	46.182200	15.905563	17 - Rendzina na laporu (flišu) ili mekim vapnencima	541
121e	Jasenak	45.255914	15.060148	58 - Smeđe na vapnencu	864
122e	G.J. Žumberak - Novoselska gora 14b Samobor	45.811385	15.637015	62 - Rendzina na dolomitu i vapnencu	361
123e	G.J. Laudonov Gaj 3b Korenica	44.798017	15.705728	56 - Smeđe na vapnencu	1067
124e	NP Risnjak 50; 90 Risnjak	45.435854	14.738564	56 - Smeđe na vapnencu	1235
64a	G.J. Pisarovinski lugovi 6a Pisarovina	45.609805	15.759338	27 - Pseudoglej na zaravi	114
65a	G.J. Đurđevačke nizinske šume 89c Đurđevac	46.145555	17.127596	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliiorirana	129
66a	G.J. Donje Međimurje 69c; 70c Kotoriba	46.375004	16.757274	44 - Močvarno glejna djelomično hidromeliiorirana	135

Legenda:

<span style="background-color: #00b0f0; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span>	poljski jasen
<span style="background-color: #008000; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span>	obični jasen
<span style="background-color: #000000; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span>	crni jasen

Tablica 42. Odabrane pozitivne lokacije gljive *H. fraxineus* za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (1/5)

Table 42. Selected positive locations of fungus *H. fraxineus* for monitoring damage degree and assessment of infection potential of fungus (1/5)

Broj uzorka	LOKACIJA	LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	OSUTOST centralnog STABLA (6-7 i 9m)			OSUTOST okolnih STABALA (6-7 i 9m)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (lipanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (srpanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (rujan 2016.)
						%	STUPANJ	TIPI	%	STUPANJ	TIPI			
1	Vibenske šume 278	G.L. Vibenske šume - Sotna 278 Viharija	44,988321	18,861422	78	45	2	UMIŠRENA	35	2	UMIŠRENA	43,00	77,00	5,00
25									2	UMIŠRENA				
45									2	UMIŠRENA				
30									2	UMIŠRENA				
30									2	UMIŠRENA				
35									2	UMIŠRENA				
15									1	BLAGA				
35									2	UMIŠRENA				
25									1	BLAGA				
30									2	UMIŠRENA				
25									1	BLAGA				
35									2	UMIŠRENA				
20									1	BLAGA				
40									2	UMIŠRENA				
30									2	UMIŠRENA				
35									2	UMIŠRENA				
35									2	UMIŠRENA				
30			2	UMIŠRENA										
3			44,988333	18,861515	70	35	2	UMIŠRENA	30	2	UMIŠRENA	28,00	39,00	3,00
35									2	UMIŠRENA				
30									2	UMIŠRENA				
10									1	BLAGA				
15									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
25									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
15									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
4	45,00541	18,74807	88	20	1	BLAGA	25	1	BLAGA	194,00	122,00	24,00		
20							1	BLAGA						
20							1	BLAGA						
20							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
5	Krajevina 708	G.L. Krajevina - Polj 708 Županja	45,005131	18,748192	88	15	1	BLAGA	10	1	BLAGA	76,00	44,00	6,00
15									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
15									1	BLAGA				
15									1	BLAGA				
15									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
10									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
20									1	BLAGA				
6	45,005935	18,74807	91	15	1	BLAGA	15	1	BLAGA	119,00	123,00	12,00		
15							1	BLAGA						
15							1	BLAGA						
10							1	BLAGA						
20							1	BLAGA						



Tablica 43. Odabrane pozitivne lokacije gljive *H. fraxineus* za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (2/5)

Table 43. Selected positive locations of fungus *H. fraxineus* for monitoring damage degree and assessment of infection potential of fungus (2/5)

Broj uzorka	LOKACIJA	LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	OSUTOST centralnog STABLA (6, 7 i 9 m)		Tip	OSUTOST okolnih STABALA (6, 7 i 9 m)		Tip	BROI APOTECIJA / 50 RAHISA (lipanj 2016.)	BROI APOTECIJA / 50 RAHISA (srpanj 2016.)	BROI APOTECIJA / 50 RAHISA (rujan 2016.)
						%	STUPANJ		%	STUPANJ				
7	Vrapčana 1	G.J. Vrapčana - Odjel 1 Vinkovci	45,261182	18,827676	66	35	2	UMIERENA	35	2	UMIERENA	0,00	0,00	0,00
8			45,261234	18,827824	66	10	0	NEMA	25	1	BLAGA			
9			45,260951	18,827575	64	20	1	BLAGA	15	1	BLAGA	0,00	0,00	0,00
10			45,259467	17,048345	86	50	2	UMIERENA	20	1	BLAGA			
11	Grede Kamare 398	G.J. Grede Kamare - 398 Jasenovac	45,259688	17,048492	86	75	3	JAKA	20	1	BLAGA	0,00	0,00	0,00
12			45,259472	17,048492	88	40	2	UMIERENA	15	1	BLAGA			
13			45,393063	16,780044	107	40	2	UMIERENA	40	2	UMIERENA	15,00	38,00	2,00
14			45,393253	16,780456	105	50	2	UMIERENA	45	2	UMIERENA			
15	Josip Kozarac 71D	G.J. Josip Kozarac - 71D Lipovljani	45,393177	16,780311	106	70	3	JAKA	50	2	UMIERENA	18,00	41,00	0,00
									60	2	UMIERENA			
									70	3	JAKA			
									45	2	UMIERENA			
									40	2	UMIERENA			

Tablica 44. Odabrane pozitivne lokacije gljive *H. fraxineus* za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (3/5)

Table 44. Selected positive locations of fungus *H. fraxineus* for monitoring damage degree and assessment of infection potential of fungus (3/5)

LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	OSUTOST centralnog STABLA (6, 7 i 9 m)			OSUTOST okolnih STABALA (6, 7 i 9 m)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (lipanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (srpanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (rujan 2016.)
				%	STUPANJ	TIP	%	STUPANJ	TIP			
G.I. Josip Kozarac - 1996 Lipovljani	45,425077	16,822017	112	70	3	JAKA	40	2	UMIJERENA	0,00	58,00	10,00
							60	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
	45,425043	16,822056	115	50	2	UMIJERENA	40	2	UMIJERENA	0,00	62,00	16,00
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
	45,425127	16,822123	114	40	2	UMIJERENA	50	2	UMIJERENA	0,00	50,00	17,00
							55	2	UMIJERENA			
							55	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
							60	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
G.I. Ključevi - 23C Nova Gradiska	45,166199	17,355093	86	40	2	UMIJERENA	50	2	UMIJERENA	9,00	192,00	203,00
							50	2	UMIJERENA			
							60	2	UMIJERENA			
							45	2	UMIJERENA			
							60	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							70	3	JAKA			
							60	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
	45,166128	17,355145	84	60	2	UMIJERENA	50	2	UMIJERENA	18,00	213,00	188,00
							60	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							50	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
G.I. Čazmanske nižinske šume - 208 Čazma	45,707409	16,586785	87	40	2	UMIJERENA	30	2	UMIJERENA	12,00	5,00	0,00
							30	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
	45,707436	16,586727	105	20	1	BLAGA	30	2	UMIJERENA	3,00	0,00	0,00
							30	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
							30	2	UMIJERENA			
	45,707435	16,586717	105	30	2	UMIJERENA	40	2	UMIJERENA	8,00	0,00	0,00
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							40	2	UMIJERENA			
							35	2	UMIJERENA			

Tablica 45. Odabrane pozitivne lokacije gljive *H. fraxineus* za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (4/5)

Table 45. Selected positive locations of fungus *H. fraxineus* for monitoring damage degree and assessment of infection potential of fungus (4/5)

LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	OSUTOST centralnog STABLA (6, 7 i 9 m)			OSUTOST okolnih STABALA (6, 7 i 9 m)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (lipanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (srpanj 2016.)	BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (rujan 2016.)
				%	STUPANJ	TIP	%	STUPANJ	TIP			
Ivanščica L5	46,186989	16,108358	881	20	1	BLAGA	40	2	UMIŠERENA	1,00	25,00	17,00
							30	2	UMIŠERENA			
							30	2	UMIŠERENA			
							20	1	BLAGA			
							25	1	BLAGA			
							40	2	UMIŠERENA			
							30	2	UMIŠERENA			
							25	1	BLAGA			
							30	2	UMIŠERENA			
							65	3	JAKA			
Ivanščica L5	46,187095	16,108071	881	30	2	UMIŠERENA	40	2	UMIŠERENA	0,00	21,00	15,00
							30	2	UMIŠERENA			
							25	1	BLAGA			
							25	1	BLAGA			
							30	2	UMIŠERENA			
							65	3	JAKA			
							50	2	UMIŠERENA			
							30	2	UMIŠERENA			
							20	1	BLAGA			
							25	1	BLAGA			
	46,187126	16,107907	881	65	3	JAKA	30	2	UMIŠERENA	0,00	4,00	18,00
							15	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							20	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
Park prirode Žumberak - Samoborsko gorje - Malinski	45,723247	15,343835	656	10	0	NEMA	10	1	BLAGA	0,00	0,00	0,00
							10	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							20	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							20	1	BLAGA			
	45,723247	15,343861	656	15	1	BLAGA	15	1	BLAGA	1,00	0,00	0,00
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							10	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							15	1	BLAGA			
							30	2	UMIŠERENA			
	45,723318	15,34403	654	30	2	UMIŠERENA	20	1	BLAGA	3,00	0,00	0,00
							20	1	BLAGA			
							80	3	JAKA			
							90	3	JAKA			
							85	3	JAKA			
							70	3	JAKA			
							70	3	JAKA			
							40	2	UMIŠERENA			
							35	2	UMIŠERENA			
							40	2	UMIŠERENA			
G.I. Goranska Dobra - Z3A Vrhovsko	45,394895	15,050652	387	40	2	UMIŠERENA	60	2	UMIŠERENA	271,00	176,00	28,00
							50	2	UMIŠERENA			
							60	2	UMIŠERENA			
							60	2	UMIŠERENA			
							80	3	JAKA			
							55	2	UMIŠERENA			
							60	2	UMIŠERENA			
							65	3	JAKA			
							80	3	JAKA			
							90	3	JAKA			
G.I. Goranska Dobra - Z3A Vrhovsko	45,394888	15,050631	387	30	2	UMIŠERENA	60	2	UMIŠERENA	169,00	130,00	37,00
							60	2	UMIŠERENA			
							60	2	UMIŠERENA			
							80	3	JAKA			
							55	2	UMIŠERENA			
							60	2	UMIŠERENA			
							65	3	JAKA			
							80	3	JAKA			
							90	3	JAKA			
							75	3	JAKA			
	45,394897	15,050492	387	65	3	JAKA	80	3	JAKA	91,00	37,00	13,00
							90	3	JAKA			
							80	3	JAKA			
							60	2	UMIŠERENA			
							65	3	JAKA			
							80	3	JAKA			
							90	3	JAKA			
							75	3	JAKA			
							80	3	JAKA			
							90	3	JAKA			

Tablica 46. Odabrane pozitivne lokacije gljive *H. fraxineus* za praćenje osutosti i procjenu infekcijskog potencijala gljive (5/5)

Table 46. Selected positive locations of fungus *H. fraxineus* for monitoring damage degree and assessment of infection potential of fungus (5/5)

Broj uzorka	LOKACIJA	LOKACIJA	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadmorska visina	OSUTOST centralnog STABLA (6; 7 i 9 m)			OSUTOST okolnih STABALA (6; 7 i 9 m)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (lipanj 2016.)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (srpanj 2016.)			BROJ APOTECIJA / 50 RAHISA (rujan 2016.)		
						%	STUPANJ	TIP	%	STUPANJ	TIP									
34			45,383596	14,87251	771	50	2	UMIERENA	50	2	UMIERENA	48,00		19,00	12,00					
									40	2	UMIERENA									
									55	2	UMIERENA									
									55	2	UMIERENA									
									45	2	UMIERENA									
35	Belewine 11A, 10B	G.J. Belewine - 11A, 10B Zalesna	45,383509	14,873481	781	90	3	JAKA	50	2	UMIERENA	51,00		23,00	18,00					
									60	2	UMIERENA									
									70	2	UMIERENA									
									40	2	UMIERENA									
									35	2	UMIERENA									
36			45,382926	14,873513	772	50	2	UMIERENA	50	2	UMIERENA	139,00		42,00	13,00					
									60	2	UMIERENA									
									55	2	UMIERENA									
									40	2	UMIERENA									
									50	2	UMIERENA									
37			45,371741	14,78118	704	80	3	JAKA	65	3	JAKA	223,00		127,00	54,00					
									70	3	JAKA									
									50	2	UMIERENA									
									55	2	UMIERENA									
									70	3	JAKA									
38	Petehovac 22A	G.J. Petehovac - 22A Delince	45,371343	14,78112	701	65	3	JAKA	65	3	JAKA	224,00		89,00	43,00					
									70	3	JAKA									
									80	3	JAKA									
									50	2	UMIERENA									
									60	2	UMIERENA									
39			45,371269	14,780964	703	70	3	JAKA	55	2	UMIERENA	116,00		72,00	11,00					
									70	3	JAKA									
									65	3	JAKA									
									65	3	JAKA									
									80	3	JAKA									
40			45,012249	15,197498	650	70	3	JAKA	80	3	JAKA	131,00		80,00	9,00					
									75	3	JAKA									
									90	3	JAKA									
									65	3	JAKA									
									55	2	UMIERENA									
41	Pernari	Lika - Pernari	45,012613	15,197606	650	90	3	JAKA	90	3	JAKA	84,00		54,00	14,00					
									70	3	JAKA									
									80	3	JAKA									
									75	3	JAKA									
									60	2	UMIERENA									
42			45,012439	15,197323	649	80	3	JAKA	80	3	JAKA	137,00		76,00	4,00					
									65	3	JAKA									
									80	3	JAKA									
									90	3	JAKA									
									75	3	JAKA									

Tablica 47. Odabrani uzorci *H. fraxineus* za morfološku tipizaciju rasta pri različitim temperaturama

Table 47. Selected samples of *H. fraxineus* for determination of morphological growth rate at different temperatures

TABLICA ODABRANIH UZORAKA <i>H. fraxineus</i> ZA MORFOLOŠKU TIPIZACIJU RASTA PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA										
Identifikacijski broj izolata	LOKACIJA	Identifikacijski broj lokacije	Geografska širina φ N	Geografska dužina λ E	Nadomska visina	Tip idiomorfa	Virus HfMW1	PROSJEK RASTA NA 10 °C	PROSJEK RASTA NA 20 °C	PROSJEK RASTA NA 30 °C
1	Lipovljani 1996	1	45.425043	16.822056	115	2	0	0,75	5,75	0,00
2	NG K1		45.252200	17.361963	112	1	1	0,44	7,42	0,00
3	jasenovac 42C		45.255115	17.051017	88	1	0	1,50	5,25	0,00
4	CZ K3	2	45.752674	16.583326	102	2	0	0,00	2,75	0,00
5	CZ K3		45.753378	16.582857	102	1	1	0,00	7,73	0,00
6	CZ K40		45.752746	16.582340	102	1	1	0,55	2,46	0,00
7	Brinje L2	3	45.026501	15.189707	543	2	0	0,06	2,73	0,00
8	Brinje L3		45.001524	15.251416	617	1	0	0,56	8,44	0,00
9	Brinje L4		44.999181	15.304540	536	1	0	0,58	7,38	0,00
10	vanštica L1	4	46.179721	16.120705	983	2	0	1,21	3,82	0,00
11	vanštica L3		46.182698	16.12570	1024	1	0	0,00	3,58	0,00
12	vanštica L5		46.187402	16.108232	881	1	0	0,00	2,86	0,00
13	Delnice L3.1	5	45.371343	14.781120	701	2	0	0,06	2,02	0,00
14	Zalesna L3.2		45.383509	14.873481	781	1	1	0,56	4,98	0,00
15	Virovsko L1		45.394888	15.050631	387	2	1	0,81	2,92	0,00
16	Vrharske šume 91B.1	6	45.024864	18.980042	80	1	0	1,44	7,35	0,00
17	Vrharske šume 91B.2		45.022798	18.981058	80	1	0	1,06	8,44	0,00
18	Vrharske šume 91B.3		45.025301	18.983154	80	1	0	1,12	4,21	0,00
19	Soulnes J1	7	50.181176	4.737623	152	2	1	0,00	0,77	0,00
20	Soulnes J2		50.194740	4.713733	200	2	1	0,00	0,73	0,00
21	Soulnes J11		50.199408	4.742941	202	1	0	0,00	3,46	0,00
22	Nafature J1ter	8	49.907281	4.900151	392	2	0	0,55	5,13	0,00
23	Nafature J1		49.916362	4.891765	386	2	1	0,96	4,40	0,00
24	Nafature P		49.918326	4.928948	393	2	0	0,83	6,62	0,00
25	Gemboux N2	9	50.504478	4.674031	154	2	1	0,67	3,48	0,00
26	Gemboux J111		50.532666	4.694169	165	2	1	1,15	4,52	0,00
27	Gemboux J11		50.594333	4.782738	185	2	0	0,73	4,94	0,00
28	Chevetogne A	10	50.223330	5.085148	300	1	0	0,00	3,29	0,00
29	Chevetogne 411		50.236354	5.139941	255	2	1	0,33	3,59	0,00
30	Heer J1		50.168458	4.830210	169	2	1	0,38	2,50	0,00
31	Ruile J11f	12	49.741326	5.556740	411	2	1	0,79	5,04	0,00
32	Ruile J11pet		49.737420	5.585857	415	2	1	0,00	3,56	0,00
33	Florifoux J1	13	50.463922	4.771629	177	2	0	0,98	3,23	0,00
										PROSJEK RASTA NA 30/20 °C
										20,83
										24,67
										20,58
										6,88
										10,75
										4,67
										2,92
										28,42
										20,63
										6,25
										8,83
										4,75
										4,92
										0,00
										1,67
										32,63
										36,42
										38,59
										0,00
										0,00
										0,00
										0,00
										20,09
										0,00
										26,42
										0,00
										0,00
										3,75
										0,00
										4,92
										0,00

Tablica 48. Popis izolata za molekularne analize s rezultatima prisutnosti mitovirusa i tipom idiomorfa

Table 48. List of isolates used for molecular analysis with results of presence HfMV1 and mating type

TABLICA IZOLATA ZA MOLEKULARNE ANALIZE				Mycovirus HfMV1 (1; 0)	Tip Idiomorfa (1; 2)
BROJ IZOLATA	LOKACIJA	DRŽAVA	BROJ LOKACIJE	control 300 bp; virus 511 bp	
1	Lipovljani 199G	CROATIA	1	0	2
2	NG K1	CROATIA	1	1	1
3	Jasenovac 42C	CROATIA	1	0	1
4	CZ K3	CROATIA	2	0	2
5	CZ K23	CROATIA	2	1	1
6	CZ K40	CROATIA	2	1	1
7	Brinje L2	CROATIA	3	0	2
8	Brinje L3	CROATIA	3	0	1
9	Brinje L4	CROATIA	3	0	1
10	Ivanščica L1	CROATIA	4	0	2
11	Ivanščica L3	CROATIA	4	0	1
12	Ivanščica L5	CROATIA	4	0	1
13	Delnice L3.1	CROATIA	5	0	2
14	Zalesina L3.2	CROATIA	5	1	1
15	Vrbovsko L1	CROATIA	5	1	2
16	Vrbanske šume 91B.1	CROATIA	6	0	1
17	Vrbanske šume 91B.2	CROATIA	6	0	1
18	Vrbanske šume 91B.3	CROATIA	6	0	1
19	Soulmes 1I	BELGIUM	1	1	2
20	Soulmes 2I	BELGIUM	1	1	2
21	Soulmes 1II	BELGIUM	1	0	1
22	Nafrature 1I ter	BELGIUM	2	0	2
23	Nafrature 3I	BELGIUM	2	1	2
24	Nafrature P	BELGIUM	2	1	2
25	Gembloux N2	BELGIUM	3	1	2
26	Gembloux 1III	BELGIUM	3	1	2
27	Gembloux 7II	BELGIUM	3	0	2
28	Chevetogne A	BELGIUM	4	0	1
29	Chevetogne 4II	BELGIUM	4	1	2
30	Heer 3II	BELGIUM	5	1	2
31	Rulles 1IIF	BELGIUM	6	1	2
32	Rulles 2IIpet	BELGIUM	6	1	2
33	Floriffoux 3I	BELGIUM	7	0	2

Tablica 49. Tablica kvantifikacije ekstrahirane DNA i qPCR (Ct) vrijednosti praga

Table 49. Quantification table of extracted DNA and qPCR (Ct) threshold values

BROJ UZORKA	EKSTRAKCIJA DNA I qPCR		KVANTIFIKACIJA (Q)			Razrijeđivanje do 1 ng/μl	qPCR (Ct)
	LOKACIJA	TIP HOMOGENIZACIJE	Q (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260</sub>	Dodatak vode (μl) na 5 μl uzorak	
1	Lipovljani 199G	Micro pistil	12,4	1,71	0,031	57	19,28
2	NG K1	Micro pistil	14,8	1,74	0,045	69	18,19
3	Jasenovac 42C	Micro pistil	12,8	1,8	0,048	59	17,99
4	CZ K3	Micro pistil	9,6	1,48	0,021	43	18,11
5	CZ K23	Micro pistil	4,3	1,57	0,01	16,5	18,36
6	CZ K40	Micro pistil	3,8	1,78	0,008	14	17,57
7	Brinje L2	Micro pistil	3,1	1,8	0,007	10,5	18,35
8	Brinje L3	Micro pistil	5,8	1,79	0,012	24	17,6
9	Brinje L4	Micro pistil	3,9	1,48	0,013	14,5	17,31
10	Ivanščica L1	Micro pistil	4	1,53	0,01	15	17,65
11	Ivanščica L3	Micro pistil	1,8	1,89	0,004	4	17,29
12	Ivanščica L5	Micro pistil	8,4	1,69	0,017	37	18,48
13	Delnice L3.1	Micro pistil	3,3	2,5	0,005	11,5	17,59
14	Zalesina L3.2	Micro pistil	6,1	3,01	0,01	25,5	17,61
15	Vrbovsko L1	Micro pistil	10	1,9	0,048	45	18,5
16	Vrbanske šume 91B.1	Micro pistil	23,2	1,74	0,065	111	18,08
17	Vrbanske šume 91B.2	Micro pistil	4,8	1,54	0,014	19	18,1
18	Vrbanske šume 91B.3	Micro pistil	21,5	1,82	0,065	102,5	17,79
19	Soulmes 1I	Micro pistil	10,6	1,78	0,097	48	17,81
20	Soulmes 2I	Micro pistil	17,5	1,91	0,034	82,5	17,94
21	Soulmes 1II	Micro pistil	4	1,03	0,01	15	17,66
22	Nafraiture 1I ter	Micro pistil	10,9	1,72	0,024	49,5	18,3
23	Nafraiture 3I	Micro pistil	14,6	1,77	0,039	68	17,6
24	Nafraiture P	Micro pistil	4,6	1,01	0,013	18	17,71
25	Gembloux N2	Micro pistil	12,3	1,46	0,026	56,5	17,02
26	Gembloux 1III	Micro pistil	2,3	1,24	0,007	6,5	16,66
27	Gembloux 7II	Micro pistil	13,1	1,93	0,025	60,5	17,95
28	Chevetogne A	Micro pistil	8,3	1,59	0,018	36,5	17,71
29	Chevetogne 4II	Micro pistil	16,5	1,76	0,036	77,5	17,27
30	Heer 3II	Micro pistil	6,4	1,34	0,017	27	17,07
31	Rulles 1IIF	Micro pistil	6,9	1,75	0,014	29,5	17,54
32	Rulles 2IIpet	Micro pistil	1,8	20,7	0,003	4	16,55
33	Floriffoux 3I	Micro pistil	4,8	2,09	0,01	19	17,43
34	Vrbanske šume 91B.2	Liquid N <sub>2</sub>	18,6	1,76	0,038	88	
35	Lipovljani 199G	Liquid N <sub>2</sub>	16,4	1,67	0,037		
36	Text -	Micro pistil	-				-
37	Text -	Micro pistil	-				-
38	Text -	Micro pistil	-				-
39	Text -	Micro pistil	-				-
40	Text -	Micro pistil	-				-



Tablica 50. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (1/3)

Table 50. Correlation of biogenic elements concentration in ash leaves with necrosis length (1/3)

	Al (mg/kg)	B (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Mo (mg/kg)	Na (mg/kg)	Sr (mg/kg)	Ti (mg/kg)	Zn (mg/kg)	N (mg/kg)	C (mg/kg)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Prosiek duljine nekroza
Al (mg/kg)	1	0.29	-0.398	0.839 <sup>**</sup>	0.928 <sup>**</sup>	0.164	-0.435	0.232	-0.135	0.701 <sup>**</sup>	-0.076	0.015	0.482 <sup>*</sup>	-0.053	-0.216	-0.115	-0.187
B (mg/kg)	0.29	1	0.540 <sup>*</sup>	0.337	0.26	0.235	0.185	0.003	0.559 <sup>*</sup>	0.541 <sup>*</sup>	0.315	0.425	-0.520 <sup>*</sup>	0.429	0.620 <sup>**</sup>	0.361	0.392
Ba (mg/kg)	0.244	0.244	1	0.172	0.297	0.347	0.462	0.991	0.016	0.02	0.203	0.079	0.027	0.076	0.006	0.141	0.107
Cr (mg/kg)	0.102	0.102	0.102	1	-0.317	0.166	0.596 <sup>**</sup>	-0.322	0.733 <sup>**</sup>	0.107	0.613 <sup>**</sup>	0.433	-0.743 <sup>**</sup>	0.571 <sup>*</sup>	0.626 <sup>**</sup>	0.519 <sup>*</sup>	0.452
Fe (mg/kg)	0.928 <sup>**</sup>	0.928 <sup>**</sup>	0.928 <sup>**</sup>	0.928 <sup>**</sup>	1	0.152	0.152	0.192	0.001	0.673	0.007	0.073	0	0.013	0.005	0.027	0.06
Mn (mg/kg)	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	1	0.105	0.15	-0.183	0.680 <sup>**</sup>	-0.219	0.138	0.42	-0.108	0.005	-0.162	-0.286
Mo (mg/kg)	-0.435	-0.435	-0.435	-0.435	-0.435	-0.435	1	0.553	0.468	0.002	0.383	0.585	0.083	0.67	0.985	0.52	0.25
Na (mg/kg)	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	1	-0.117	0.753 <sup>**</sup>	-0.155	0.236	0.494 <sup>*</sup>	0.004	-0.09	-0.083	-0.156
Sr (mg/kg)	-0.135	-0.135	-0.135	-0.135	-0.135	-0.135	-0.135	-0.135	1	0.753 <sup>**</sup>	-0.155	0.236	0.494 <sup>*</sup>	0.004	-0.09	-0.083	-0.156
Ti (mg/kg)	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	0.701 <sup>**</sup>	1	0.538	0.346	0.037	0.986	0.721	0.744	0.538
Zn (mg/kg)	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	-0.076	1	0.236	0.494 <sup>*</sup>	0.004	-0.09	-0.083	-0.156
N (mg/kg)	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	1	0.482 <sup>*</sup>	-0.053	-0.216	-0.115	-0.187
C (mg/kg)	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.482 <sup>*</sup>	1	0.053	0.216	0.115	0.187
Ca (mg/kg)	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	-0.053	1	0.626 <sup>**</sup>	0.519 <sup>*</sup>	0.452
K (mg/kg)	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	-0.216	1	0.519 <sup>*</sup>	0.452
Mg (mg/kg)	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	-0.115	1	0.452
Prosiek duljine nekroza	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	-0.187	1

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
 \* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tablica 51. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (2/3)

Table 51. Correlation of biogenic elements concentration in ash leaves with necrosis length (2/3)

	Al (mg/kg)	B (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Mo (mg/kg)	Na (mg/kg)	Sr (mg/kg)	Ti (mg/kg)	Zn (mg/kg)	N (mg/kg)	C (mg/kg)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Prosjeak duljine nekroza
Mn (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	0.164 0.516	0.235 0.347	0.166 0.511	0.105 0.678	0.291 0.241	1 0.773	0.073 0.432	-0.198 0.631	0.581	0.17 0.501	0.770	-0.225 0.366	0.753	0.314 0.205	0.765	0.546
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Mo (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-0.435 0.072	0.185 0.462	0.596 0.009	-0.286 0.251	-0.339 0.169	0.073 0.773	1 0.053	-0.463 0.053	0.511	0.015 0.954	0.366 0.136	0.377 0.123	-0.583 0.494	0.413 0.089	0.341 0.166	0.156
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Na (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	0.232 0.354	0.003 0.991	-0.322 0.192	0.15 0.553	0.2 0.425	-0.198 0.432	1 0.053	-0.358 0.144	-0.121 0.631	-0.162 0.521	-0.187 0.456	0.15 0.551	-0.333 0.177	-0.091 0.72	-0.388 0.112	0.098
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Sr (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-0.135 0.594	0.559 0.016	0.733 0.001	-0.183 0.468	-0.117 0.644	0.631 0.005	0.511 0.03	-0.358 0.144	1 0.482	0.522 0.026	0.666 0.003	-0.739 0	0.954 0	0.597 0.009	0.847	0.577
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Ti (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	0.701 0.001	0.541 0.02	0.107 0.673	0.680 0.002	0.753 0	0.581 0.011	0.015 0.954	-0.121 0.631	0.482 0.043	1 0.225	0.46 0.055	0.032 0.899	0.542 0.02	0.13 0.607	0.356 0.147	0.162
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Zn (mg/kg)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-0.076 0.765	0.315 0.203	0.613 0.007	-0.219 0.383	-0.155 0.538	0.17 0.501	0.366 0.136	-0.162 0.521	0.522 0.026	1 0.368	0.175 0.488	-0.308 0.214	0.467 0.05	0.086 0.735	0.305 0.218	0.275
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tablica 52. Korelacija koncentracija biogenih elemenata u lišću klonova s duljinom nekroza (3/3)

Table 52. Correlation of biogenic elements concentration in ash leaves with necrosis length (3/3)

	Al (mg/kg)	B (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Mo (mg/kg)	Na (mg/kg)	Sr (mg/kg)	Ti (mg/kg)	Zn (mg/kg)	N (mg/kg)	C (mg/kg)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Prosjeak duljine nekroza
N (mg/kg)	0,015	0,425	0,433	0,138	0,236	0,770**	0,377	-0,187	0,666**	0,46	0,175	1	-0,415	0,768**	0,705**	0,665**	0,573*
Pearson Correlation	0,951	0,079	0,073	0,585	0,346	0	0,123	0,456	0,003	0,055	0,488	0,087	0,087	0	0,001	0,003	0,013
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
C (mg/kg)	0,482*	-0,520*	-0,743**	0,42	0,494*	-0,225	-0,583*	0,15	-0,739**	0,032	-0,308	-0,415	1	-0,618**	-0,739**	-0,647**	-0,554*
Pearson Correlation	0,043	0,027	0	0,083	0,037	0,368	0,011	0,551	0	0,899	0,214	0,087	0,006	0,006	0	0,004	0,017
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Ca (mg/kg)	-0,053	0,429	0,571*	-0,108	0,004	0,753**	0,494*	-0,333	0,954**	0,542*	0,467	0,768**	-0,618**	1	0,536*	0,856**	0,563*
Pearson Correlation	0,834	0,076	0,013	0,67	0,986	0	0,037	0,177	0	0,02	0,05	0	0,006	0,022	0,022	0	0,015
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
K (mg/kg)	-0,216	0,620*	0,626**	0,005	-0,09	0,314	0,413	-0,091	0,597**	0,13	0,086	0,705**	-0,739**	0,536*	1	0,533*	0,550*
Pearson Correlation	0,39	0,006	0,005	0,985	0,721	0,205	0,089	0,72	0,009	0,607	0,735	0,001	0	0,022	0,023	0,023	0,018
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Mg (mg/kg)	-0,115	0,361	0,519*	-0,162	-0,083	0,765**	0,341	-0,388	0,847**	0,356	0,305	0,665**	-0,647**	0,856**	0,533*	1	0,558*
Pearson Correlation	0,65	0,141	0,027	0,52	0,744	0	0,166	0,112	0	0,147	0,218	0,003	0,004	0	0,023	0,016	0,016
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Prosjeak 12	-0,187	0,392	0,452	-0,286	-0,156	0,546*	0,158	0,098	0,577*	0,162	0,275	0,573*	-0,554*	0,563*	0,550*	0,558*	1
Pearson Correlation	0,457	0,107	0,06	0,25	0,538	0,019	0,531	0,7	0,012	0,52	0,269	0,013	0,017	0,015	0,018	0,016	1
Sig. (2-tailed)	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## 9. SUMMARY

Common ash (*Fraxinus excelsior* L.) and narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) populations, have been seriously threatened in the last two decades all across Europe. These two species are economically and ecologically very important in mountain and lowland forests of Croatia, have recently developed more prominent decline symptoms. Specific mechanisms which cause this phenomenon are more clear in *F. excelsior* dieback as dominant role plays *Hymenoscyphus fraxineus* (anamorph: *Chalara fraxinea*). But, in the case of *F. angustifolia* are not yet identified, however the newly discovered fungal pathogen *H. fraxineus* represents the highest direct danger for the existence of these stands. The fungus causes different symptoms, it can colonise practically all host tissues, and the end result of the infection is crown dieback and often progression and dieback of the whole tree. Occurrence of unprecedented number of new fungal diseases has recently caused diebacks and declines of several host species. This research determines the distribution and the function of fungal pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*, and its overall role in declining of *Fraxinus* spp. in mountain and lowland regions of Croatia. Also the possibility of its biological control, and the susceptibility of seedlings to the infection of this pathogen which could give a contribution to the solution of this rising problem.

The fungal pathogen *H. fraxineus* was first described in Croatia in 2009, during the next two years period was well established and systematically spread across the whole area of common and narrow-leaved ash population. Across the mountains and hill areas infection spread from common ash to lowland area on narrow-leaved ash, where it continued to spread along main river Sava to the eastern state border. It is very likely that the river flow naturally sustained the humidity necessary for the survival of the pathogen and its spread. The disease is not present in the thermophilic communities on the Mediterranean prevailing area of manna ash.

Damage stand assessments results are correlated with first pathogen infection appearance and infection potential of the pathogen on the individual locations in Croatia. That is why the highest damage degrees are in the mountain area. The damage degrees slowly recedes from west to east of Croatia and from north to south. Moderate damage degree in the area of long infection period could be the illusion of partially regenerating stands by eliminating the dead ash trees from the stand area. There is statistically significant positive correlation between average number of apothecium and tree damage degree. Correlation of apothecium number by month according to ash species tells us that the number of apothecium changes every month for every species but according to some third factor (most likely temperature and

precipitation). It is clear that on the production of apothecium does not influence the host ash species, and that number of apothecium correlates with the month of collection.

Fungal species that were most commonly isolated from the ash tissue, beside the *H. fraxineus*, correspond to the most commonly isolated species in ash tissue also in the other research publications. They have a strong or weak pathogenic activity, but mostly as a secondary decline agent. The activity of the pathogen *H. fraxineus* as the primary cause of ash dieback is accompanied with other fungal species that participate in the decline and cause progressive, faster degradation of ash tree vitality.

The colonies of *H. fraxineus* isolates grown *in vitro* show significant morphological variations, especially in colour, structure, formation of mycelium, sporulation, pseudoparenchymatic stromata and production of secondary metabolites. Two main morphotypes of fungal isolates *H. fraxineus* were established, type 1 with eight subdivisions and type 2 with two subdivisions. Low temperatures inhibit the growth of fungal isolates, and high temperatures inhibit and sterilise the *H. fraxineus* isolates. Temperature of 10 °C drastically reduced the isolate growth, and the isolate grew 0.73 – 43.10 times slower than on 20 °C. All isolates grew fastest on optimal 20 °C temperature and with highest growth variation. None of the isolates grew on 30 °C. Temperature of 30 °C caused the mortality of 5.5% Croatian and 60% Belgian isolates.

Real time qPCR was used for detection and identification of fungus *H. fraxineus* in ash tissues which confirmed the identity of 33 isolates. *H. fraxineus* has heterothallic reproduction system unlike *H. albidus* which system is structurally homothallic. The mating type ratio MAT1:MAT2 did not support the 1:1 ratio, and the ratio was 2:1 in Croatian isolates and 6:1 in Belgian isolates. Mating type ratio shows influence related to geographical origin of isolates. Mitoviruses are commonly found in all major group of plant pathogenic fungus. Some of these viruses can cause debilitating disease or reduce virulence in its hosts. All 33 isolates (18 Croatian and 15 Belgian) were tested for the presence of the virus HfMV1. Mitovirus HfMV1 was found in 27.7% of Croatian and 66.7% of Belgian isolates. There is a significant statistical difference in virus prevalence between populations, which could be the reason of more virulent isolate prevalence in Croatia. RAMS markers were frequently used to characterise the genetic variability. Genetic variability of the fungus *H. fraxineus* was determined according to the multiple loci across the genome. We did not find individuals with identical haplotype which points to conclusion that the only propagation method in *H. fraxineus* is the formation of ascospores. We determined two populations, according to

genetic variability, which could be subdivided in 7 isolate groups. The populations do not correspond with geographical origin of the isolates (Croatia and Belgium). We did not confirm correlation of genetic variability with height above sea level, but it could be because of the small number of samples, and relatively small number of visible DNA fragments (17). High genetic variability could be related with the need to adapt on different climatic conditions, that is why the growth and spread of the fungal pathogens strongly correlates with moisture and temperature. Adaptive potential to this conditions could be the essential factor for survival and can influence the virulence of the pathogen. Isolates of *H. fraxineus* show significant difference *in vitro* in growth rate according to temperature which corresponds to genetic variability. Differences in growth did not correspond only to the isolates of distant geographical origin, but also to the isolates deriving from the same forest district. High rate of genetic variability corresponds to the organisms with sexual reproduction and broad geographical distribution, but it is unexpected for the pathogen who was introduced in Europe.

Research on different types of agar medium with leaf extract of indigenous ash species in Croatia established the stimulation of pathogen isolate growth on all mediums with leaf extracts. The fastest growing isolate was on extract medium of common ash (*F. excelsior*), the second on extract medium of manna ash (*F. ornus*) and the last was extract medium of narrow-leaved ash (*F. angustifolia*). High variability of growth on narrow-leaved ash extract could be explained with similar results of high intra-clonal variability on narrow-leaved ash clones susceptibility trial. Growth rates of isolates on different mediums with leaf extract correlates with the susceptibility of ash host species.

Activity of UVB and UVA light spectrum is strong enough to reduce growth and sporulation of fungus but not enough to kill it inside the agar medium. Stress and influence on fungus by aggressive treatment of ultraviolet light with lower wave lengths is enough to violate normal metabolic fungal functions. On higher wave lengths of ultraviolet light, the light is not aggressive enough or the fungus is probably more adopted to higher wave lengths of the UV light, which coincidentally activates fungal survival and causes the fungus to reproduce intensively. This could be because the continuous exposure to visible light spectrum fungus has created tolerance for the frequencies of this specific wave lengths.

*In vitro* and *in vivo* experiments confirmed the main role of temperature on fungal growth and necrotic lesions development on seedlings in nature, and also that necrosis growth, besides the

temperature, also depends directly on ash host species. Necrosis growth and development are statistically significantly lower on narrow-leaved ash than on common ash.

High inter-clonal variability in susceptibility trial could be related with the method of vegetative propagation which was used for the production of clonal seedlings. Significant susceptibility of clones was established by the increase of disease progression on 97% in just first four months from the inoculation process, and also continuous breakage of resistant trait with confirmed mortality rate of 49% after one year monitoring period. In Croatia plus trees and seedlings for the establishment of clonal seed orchards were collected in natural stands of narrow-leaved ash before the occurrence of ash dieback disease, where natural selection derived by the susceptibility of individual genotypes, had not been started yet. Also, the age of seedlings used in the experiment could have been the reason for high mortality rate, considering younger trees are more susceptible to the disease. None of the tested clones showed total resistance to the pathogen *H. fraxineus*, but some of the clones showed reduced susceptibility. The least susceptible or the most tolerant clones regarding the pathogen *H. fraxineus* were two clones from the clonal seed orchard Čazma (BJ25 and BJ38), and two clones from the clonal seed orchard Nova Gradiška (NG03 and NG31). Coefficient of variation for the necrosis length revealed that only small portion of tested clones has small coefficient of variation which correlates with final result of necrosis length. Only the result with small necrosis length and small coefficient of variation can be considered for second progeny trial.

Based on the phenological research it was established that most of the *F. angustifolia* clones have normal vegetation period length, and the clones have been distributed in the early and late phenotypic form according to seasonal leaf flushing and leaf shedding. Early phenotypic form shows correlation with small and medium necrosis lengths, while late phenotypic form has no correlation with necrosis length. Results of short or long vegetation period of narrow-leaved ash do not correlate with average necrosis lengths, so based on the given results there is no correlation between the necrosis lengths and the vegetation period or the phenotypic form based on flushing phenology. Ideal clone for the future research in susceptibility to the pathogen *H. fraxineus* is clone NG31 who has shown shorter vegetative period and reduced average necrosis length.

Positive correlations in necrosis lengths and nutritive element values suggest that narrow-leaved ash during the pathogen attack accumulates biogenic elements in the leaves. Nutritive values of the leaves were lower than the minimum deficiency values for Zn, N and K

elements. Influence of reduced Mn values and increased Zn values on pathogen necrosis growth should be investigated further in detail because there is a possibility that reduced or increased values of these elements affect and cause the reduction of pathogen activity. Concentrations of reduced Fe values in infected clones is consistent with other research and it also needs to be researched further in detail. Comparisment of susceptible clones based on necrosis lengths and the susceptible clones based on nutritive analyses does not show coherence of results. Considering the values of individual nutritive elements there is no uniformity in the results, consequently interaction of pathogen and host genotype influence differently every individual element, therefore in some element causing increase and in other reduction of values in relation to control.

Hipovirulence in *H. fraxineus* caused by the mitovirus HfMV1 was not proven in the test. Reduction of necrotic lesions was established on common ash with fungal isolates that contain HfMV1, but this reductions were not statistically significant according to necrosis developed by the fungal isolates that do not contain the virus. There is statistically significant reduction of seedlings diameter growth on every infected seedling compared to control uninfected seedlings regardless of the mitovirus presence

*In vitro* tests of isolate growth and fructification by application methods of Allicin biological agent after and before the infection showed that significant reduction in growth and fructification of the isolates is possible. Inadequate low dosage can cause hiperproduction of spores as a reaction of fungus survival instinct. *In vivo* tests by injection methods of Allicin agent in infected seedlings of narrow-leaved ash showed that the agent did not fully stopped necrosis growth, but it can slow down the progression of the disease.



## 10. LITERATURA

- Aćimović, S. G., Vanwoerkom, A. H., Reeb, P. D., Vandervoort, C., Garavaglia, T., Cregg, B. M. and Wise, J. C. (2014) 'Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies', *Pest Management Science*, 70(11), pp. 1751–1760. doi: 10.1002/ps.3747.
- Agrios, G. N. (1997) 'Plant Pathology', in *Plant pathology.*, p. 635. doi: 10.1007/978-1-59745-062-1.
- Akilli, S., Ulubaş Serçe, Ç., Katircioğlu, Y. Z. and Maden, S. (2013) 'Phytophthora dieback on narrow leaved ash in the black sea region of turkey', *Forest Pathology*, 43(3), pp. 252–256. doi: 10.1111/efp.12024.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Guldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M. H. and Dickman, M. (2011) 'Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *botrytis cinerea*', *PLoS Genetics*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1002230.
- Anagnostakis, S. L. (1982) 'Biological control of chestnut blight.', *Science*, 215, pp. 466–471. doi: 10.1126/science.215.4532.466.
- Andersson, P. F., Bengtsson, S., Cleary, M., Stenlid, J. and Broberg, A. (2013) 'Viridin-like steroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*.', *Phytochemistry*, 86, pp. 195–200. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.09.012.

- Andersson, P. F., Bengtsson, S., Stenlid, J. and Broberg, A. (2012) 'B-norsteroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*.', *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(7), pp. 7769–81. doi: 10.3390/molecules17077769.
- Andersson, P. F., Johansson, S. B. K., Stenlid, J. and Broberg, a. (2010) 'Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash', *Forest Pathology*, 40(1), pp. 43–46. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00605.x.
- Andrić, I., Poljak, I., Milotić, M., Kajba, D., 2016: Fenološka svojstva listanja poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u klonskoj sjemenskoj plantaži. *Šumarski list*, 3-4: 117-126.
- Andrić, I., Kajba, D., 2017: The impact of environmental drivers on narrow-leaved ash *Fraxinus angustifolia* budburst dates. *Šumarski list*, 1-2: 7-13.
- Anić, I., (2004) Zagrebačka škola uzgajanja šuma i gospodarenje nizinskim šumama. *Bilten parka prirode Lonjsko polje*, 6(2):25-37.
- Anić, I., (2001) Uspijevanje i pomlađivanje sastojina poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u Posavini. *Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, 1-197.
- Babić, M., Radić, S., Cvjetko, P., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B., and Pavlica, M. (2009) 'Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium (I)-acetate'. *Aquatic Botany*, 91(3), 166-172.
- Bakys, R., (2013) Dieback of *Fraxinus excelsior* in the Baltic sea region. Associated Fungi, Their Pathogenicity and Implications for Silviculture: *Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences*: pp. 1-48.
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K. and Stenlid, J. (2009a) 'Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*', *Plant Pathology*, 58(2), pp. 284–292. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01977.x.
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Thomsen, I. M. and Stenlid, J. (2009b) 'Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden', *European Journal of Forest Research*, 128(1), pp. 51–60. doi: 10.1007/s10342-008-0238-2.

- Bakys, R., Vasaitis, R. and Skovsgaard, J. P. (2013) 'Patterns and severity of crown dieback in young even-aged stands of european ash (*fraxinus excelsior* l.) in relation to stand density, bud flushing phenotype, and season', *Plant Protection Science*, 49(3), pp. 120–126.
- Bakys, R., Vasiliauskas, A., Ihrmark, K., Stenlid, J., Menkis, A. and Vasaitis, R. (2011) 'Root rot, associated fungi and their impact on health of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania', *Scandinavian Journal of Forest Research*, 26(2), pp. 128–135. doi: 10.1080/02827581.2010.536569.
- Baral, H.O., Queloz, V. and Hosoya, T. (2014) 'Hymenoscyphus fraxineus, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe.', *IMA fungus*, 5(1), pp. 79–80. doi: 10.5598/ima fungus.2014.05.01.09.
- Barić, L., Županić, M., Pernek, M. and Diminić, D. (2012) 'Prvi nalazi patogene gljive *Chalara fraxinea* u Hrvatskoj – novog uzročnika odumiranja jasena ( *Fraxinus* spp .) FIRST RECORDS OF *Chalara fraxinea* IN CROATIA – A NEW AGENT OF ASH DIEBACK (*Fraxinus* spp.)', *Šumarski List*, 9–10(1), pp. 461–469.
- Bengtsson, S.B.K., 2013: Dieback of *Fraxinus excelsior*. Biology of Ash Dieback and Genetic Variation of the Fungus *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Doctoral thesis, Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences*: pp. 1-51.
- Bengtsson, M., Green, H., Leroul, N., Pedersen, H. L. and Hockenhull, J. (2006) 'Effect of autumn application of urea on saprotrophic fungi in off-season leaf litter of sour cherry and evaluation of fungal isolates to reduce primary inoculum of *Blumeriella jaapii*', *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(3), pp. 107–112.
- Bengtsson, S. B. K., Vasaitis, R., Kirisits, T., Solheim, H. and Stenlid, J. (2012) 'Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*', *Fungal Ecology*, 5(2), pp. 147–153. doi: 10.1016/j.funeco.2011.10.004.
- Blackwell, M. (2011) 'The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?', *American journal of botany*, 98(3), pp. 426–38. doi: 10.3732/ajb.1000298.

- Bogdan, S., 2006: Varijabilnost posavskih populacija poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u testovima polusrodnika. *Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, 1-276 pp.
- Bogdan, S., Kajba, D., Franjić, J., Idžojić, M., Škvorc, Ž., Katičić, I., 2007: Genetic variation in quantitative traits within and among Croatian narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) populations assessed in an open-pollinated progeny trial. *Periodicum biologorum*, Vol. 109, No. 1: 1-11.
- Botella, L., Tuomivirta, T.T., Vervuurt, S., Diez, J.J., Hantula, J., 2012. Occurrence of two different species of mitoviruses in the European race of *Gremmeniella abietina* var. *abietina*, both hosted by the genetically unique Spanish population. *Fung. Biol.* 116, 872–882.
- Boudier, B., (1994) Le chancre des jeunes plants de frenes [The canker of ash seedlings]. *Phytoma, La Defense des Vegtaux*, 461, 35-36.
- Bourrouet, A., García, J., Mujeriego, R. and Peñuelas, G. (2001) 'Faecal bacteria and bacteriophage inactivation in a full-scale UV disinfection system used for wastewater reclamation', in *Water Science and Technology*, pp. 187–194.
- Brasier, C., (1983) A cytoplasmically transmitted disease of *Ceratocystis ulmi*. *Nature* 305, 220-223.
- Brent, K. J. and Hollomon, D. W. (2007) Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?, FRAC Monograph 1, 2nd edition, Brussels: FRAC. doi: D/1995/2537/1.
- Bridge, P. and Spooner, B. (2001) 'Soil fungi: Diversity and detection', *Plant and Soil*, 232(1–2), pp. 147–154. doi: 10.1023/A:1010346305799.
- Bryner, S.F., Rigling, D., (2012) Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in populations of the chestnut blight fungus. *Phytopathology* 102, 1161–1167
- Brown, A. J. P., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M. D., Yin, Z., Ene, I. V., Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E. R., Childers, D. S., Shahana, S. and Leach, M. D. (2014) 'Stress adaptation in a pathogenic fungus.', *The Journal of experimental biology*, 217(Pt 1), pp. 144–55. doi: 10.1242/jeb.088930.
- Burdon, J.J., Roelfs, A.P., (1985) The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of population *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 75:1068–1073

- Carrari, E., Capretti, P., Santini, A. and Luchi, N. (2015) 'Hymenoscyphus fraxineus mycelial growth on media containing leaf extracts of different Oleaceae', *Forest Pathology*, 45(6), pp. 540–543. doi: 10.1111/efp.12238.
- Cech, T.L., (2006) Eschenchäden in Österreich – Ash Dieback and Premature Leaf Shedding in Austria. *Forstschutz Aktuell*, 37: 18-20.
- Cekstere, G., Laivins, M. and Osvalde, A. (2013) 'Destruction of young *Fraxinus excelsior* L. stands and mineral nutrition status in Latvia, a pilot study.', *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, pp. 15–27.
- Chandelier, A., Delhay, N. and Helson, M. (2011) 'First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium', *Plant Disease*, 95(2), p. 220. doi: 10.1094/PDIS-07-10-0540.
- Chandelier, A., André, F. and Laurent, F. (2010) 'Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR', *Forest Pathology*, 40(2), pp. 87–95. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00610.x.
- Cleary, M. R., Daniel, G. and Stenlid, J. (2013) 'Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*', *Plant Pathology*, 62(6), pp. 1294–1301. doi: 10.1111/ppa.12048.
- Čavlović, J., (2010) Prva nacionalna inventura šuma u Republici Hrvatskoj. *Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Ministarstvo regionalnog razvoja, šumarstva i vodnoga gospodarstva*, 300 str., Zagreb.
- Dal Maso, E., Cocking, J. and Montecchio, L. (2014) 'Efficacy tests on commercial fungicides against ash dieback in vitro and by trunk injection', *Urban Forestry and Urban Greening*. doi: 10.1016/j.ufug.2014.07.005.
- Del Maso, E., Montecchio, L., (2014) Risk of Natural Spread of *Hymenoscyphus fraxineus* with Environmental Niche Modelling and Ensemble Forecasting Technique. *Forest Research* 3 (4): 131. doi: 10.4172/2168-9776.1000131
- Dal Maso, E., Fanchin, G., Mutto Accordi, S., Scattolin, L. and Montecchio, L. (2012) 'Ultrastructural modifications in Common ash tissues colonised by *Chalara fraxinea*', *Phytopathologia Mediterranea*, 51(3), pp. 599–606.

- Davydenko, K., Vasaitis, R., Stenlid, J. and Menkis, A. (2013) 'Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: A first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*', *Forest Pathology*, 43(6), pp. 462–467. doi: 10.1111/efp.12055.
- Dawe, A. L. and Nuss, D. L. (2001) 'Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis', *Annual Review of Genetics*, 35, pp. 1–29. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.085929.
- Deacon, J. W. (2006) *Fungal Biology*, Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Debuchy, R., Turgeon, B.G., (2006) Mating-type structure, evolution, and function in *Euscomycetes*. In: Kües, U., Fischer, R (Eds.), *The Mycota*. Springer, Berlin, Heidelberg, 293-323.
- Delatour, C., Muller, C., Bonnet-Masimbert, M., (1982) Progress in acorns treatment in a long term storage prospect. *Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Seed Storage*. Chalk River, Ontario, Canada, September, 23-27, 1980. Wang, B.S.P., Pitel, J.A. (ur). Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service: 126-133.
- Delatour, C., Morelet, M., (1972) La pourriture noire des glands. *Revue Forestiere Francaise*, 31: 101-115.
- Deng, F., Xu, R. and Boland, G. J. (2003) 'Hypovirulence-associated double-stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* is conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* mitovirus 3a-Ld', *Phytopathology*, 93(11), pp. 1407–1414. doi: 10.1094/phyto.2003.93.11.1407.
- Divon, H. H. and Fluhr, R. (2007) 'Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants', *FEMS Microbiology Letters*, pp. 65–74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00504.x.
- Dobbertin, M. and Brang, P., (2001) 'Crown defoliation improves tree mortality models'. *Forest Ecology Management* Vol. 141 (3): 271-284.
- Doccola, J. J., Smitley, D. R., Davis, T. W., Aiken, J. J. and Wild, P. M. (2011) 'Tree wound responses following systemic insecticide trunk injection treatments in green ash (*Fraxinus Pennsylvanica* Marsh.) as determined by destructive autopsy', *Arboriculture and Urban Forestry*, 37(1), pp. 6–12.

- Douglas, G.C., Pliura, A., Dufour, J., Mertens, P., Jacques, D., Fernandez – Manjarez, J., Buiteveld, J., Parnuta, G., Tudoroiu, M., Curnel, Y., Thomasset, M., Jensen, V., Knudsen, M., Foffova, E., Chandelier, A. And Steenackers, M. (2013) Common ash (*Fraxinus excelsior* L.). In: Luc E. (ed.) Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives, Managing Forest Ecosystems 25, Springer Science, Business Media Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-007-6146-9\_9, p. 403-464
- Drenkhan, R. and Hanso, M. (2010) 'New host species for *Chalara fraxinea*', New Disease Reports, 22, p. 16. doi: 10.1094/PDIS-94-1-0133A.
- Eguchi, N., Tokutake, H. and Yamagishi, N. (2008) 'Hot water treatment of Japanese pear trees is effective against white root rot caused by *Rosellinia necatrix* Prillieux', Journal of General Plant Pathology, 74(5), pp. 382–389. doi: 10.1007/s10327-008-0115-3.
- Eichhorn, J., Roskams, P., Potočić, N., Timmermann, V., Ferretti, M., Mues, V., Szepesi, A., Durrant, D., Seletković, I., Schröck, H-W., Nevalainen, S., Bussotti, F., Garcia, P., Wulff, S., (2016) Part IV: Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. In: UNECE ICP Forests Programme Coordinating Centre (ed.): Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 54 p. [[https://www.icp-forests.org/pdf/manual/2016/Manual\\_Part\\_IV.pdf](https://www.icp-forests.org/pdf/manual/2016/Manual_Part_IV.pdf)]. ISBN: 978-3-86576-162-0, pristupljeno 10.4.2017.
- Ellenberg H., (1994) 'Blatt- und Nadelverlust oder standortlich wechselnde Ausbildung des Photosynthese-Apparats? Fragen zum Waldschadenbericht 1992'. *Schweiz. Z. Forstwes.* 145, pp. 413–416.
- Enderle, R., Peters, F., Nakou, A. and Metzler, B. (2013) 'Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*', European Journal of Forest Research, 132(5–6), pp. 865–876. doi: 10.1007/s10342-013-0717-y.
- Enderle, R., Nakou, A., Thomas, K., Metzler, B., (2015) Susceptibility of autochthonous German *Fraxinus excelsior* clones to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is genetically

- determined. *Annals of Forest Science* 72 (2): 183-193. doi:10.1007/s13595-014-0413-1.
- Engesser, R., Meier, F., Queloz, V., Holdenrieder, O. and Kowalski, T. (2009) 'Das Triebsterben der Esche in der Schweiz', *Wald und Holz*, 6, pp. 24–27.
- EPPO, (2010) First report of *Chalara fraxinea* in the Netherlands. EPPO Reporting Service No. 9, 2010/151, [<http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2010/Rse-1009.pdf>], pristupljeno 10.1.2017.
- EPPO, (2012) First report of *Chalara fraxinea* in the United Kingdom. EPPO Reporting Service No. 4, reference 2012/080, [<http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2012/Rse-1204.pdf>], pristupljeno 10.1.2017.
- EPPO, (2013) First report of *Chalara fraxinea* in Ireland. EPPO Reporting Service No. 1, reference 2013/004, [<http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2013/Rse-1301.pdf>], pristupljeno 10.1.2017.
- EPPO, (2013) First record of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (*Chalara fraxinea*) in Ukraine. EPPO Reporting Service No. 10, reference 2013/213, [<http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2013/Rse-1310.pdf>], pristupljeno 10.1.2017.
- EPPO (2013) 'PM 7/117 (1) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*', Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 3(43), pp. 449–461. doi: 10.1111/epp.12061.
- Esteban, R., Fujimura, T., (2008) Narnaviruses. In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Elsevier, Oxford, United Kingdom, 541–547.
- European Commission, (2009) Directive 2009/128/EC establishing a framework for community action to achieve the sustainable use of pesticides. Off. J. Eur. Comm. (21.10.2009) L309/71, 71–86.
- Fauquet, C.M., Mayo, M., maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., (2005) *Virus Taxonomy: VIII<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA.
- Favier, G. I., Escudero, M. E. and de, G. A. M. S. (2001) 'Effect of chlorine, sodium chloride, trisodium phosphate, and ultraviolet radiation on the reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria from eggshell surface', *Journal of Food*



- Protection, 64(10), pp. 1621–1623. doi: Cited By (since 1996) 11\rExport Date 2 April 2013.
- Ferracini, C. and Alma, A. (2008) ‘How to preserve horse chestnut trees from *Cameraria ohridella* in the urban environment’, Crop Protection, 27(9), pp. 1251–1255. doi: 10.1016/j.cropro.2008.03.009.
- Ferretti, M., König, N., Granke, O., (2016) Part III: Quality Assurance within the ICP Forests monitoring programme. In: UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre (ed.): Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 11 p. [[https://www.icp-forests.org/pdf/manual/2016/Manual\\_Part\\_III.pdf](https://www.icp-forests.org/pdf/manual/2016/Manual_Part_III.pdf)] ISBN: 978-3-86576-162-0, pristupljeno 10.4.2017.
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. and Gurr, S. J. (2012) ‘Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health.’, Nature. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 484(7393), pp. 186–94. doi: 10.1038/nature10947.
- Foster, S., Fitt, B.L, 2003. Isolation and characterisation of the mating-type (MAT) locus from *Rhynchosporium secalis*. *Curr. Genet*, 44, 277-286.
- Fraxigen (2005) ‘Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use’, Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK., p. 128.
- Fukarek, P., 1954: Poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl). *Šumarski list*, 78 (9-10), 433-453.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N., (2008) Fungal viruses. In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V., (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 3<sup>rd</sup> edition Elsevier, Oxford, United Kingdom, pp. 284-291.
- Giorgi, F. and Lionello, P. (2008) ‘Climate change projections for the Mediterranean region’, *Global and Planetary Change*, 63(2–3), pp. 90–104. doi: 10.1016/j.gloplacha.2007.09.005.

- Glass, N. L., Jacobson, D. J. and Shiu, P. K. T. (2000) 'The Genetics of Hyphal Fusion and Vegetative Incompatibility in Filamentous Ascomycete Fungi', *Annual Review of Genetics*, 34(1), pp. 165–186. doi: 10.1146/annurev.genet.34.1.165.
- Grad, B., Kowalski, T. and Kraj, W. (2009) 'Studies on Secondary Metabolite Produced By *Chalara Fraxinea* and Its Phytotoxic Influence on *Fraxinus Excelsior*', *Phytopathologia*, 54, pp. 61–69.
- Green, H., Bengtsson, M., Duval, X., Lindhard Pedersen, H., Hockenhull, J., Larsen, J., (2006) Influence of urea on the cherry leaf spot pathogen, *Blumeriella jaapii*, and on microorganisms in decomposing cherry leaves. *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 38, Issue 9, 2731-2742.
- Green, M. R. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Griffin, D. H., 1981. *Fungal Physiology*. John Wiley and Sons, New York.
- Gross, A., Grünig, C. R., Queloz, V. and Holdenrieder, O. (2012) 'A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*', *Forest Pathology*, 42(3), pp. 252–264. doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00751.x.
- Gross, A., Holdenrieder, O., Pautasso, M., Queloz, V. and Sieber, T. N. (2014) '*Hymenoscyphus pseudoalbidus* , the causal agent of European ash dieback', *Molecular Plant Pathology*, 15(1), pp. 5–21. doi: 10.1111/mpp.12073.
- Gross, A., Zaffarano, P. L., Duo, A. and Grünig, C. R. (2012) 'Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* ', *Fungal Genetics and Biology*, 49(12), pp. 977–986. doi: 10.1016/j.fgb.2012.08.008.
- Grünig, C. R., Sieber, T. N. and Holdenrieder, O. (2001) 'Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification', *Mycological Research*, 105(1), pp. 24–32. doi: 10.1017/S0953756200003658.
- Grzywacz, A. (1995) Ważniejsze choroby infekcyjne [The most important infectious diseases]. In W. Bugala (Ed.), *Nasze Drzewa Lesne: Jesion Wyniosły (*Fraxinus**

- excelsior* L.) [Our forest trees: European ash (*Fraxinus excelsior* L.)] (pp. 415-442). Poznan-Kornik: Sorus.
- Hagen-Thorn, A., Armolaitis, K., Callesen, I. and Stjernquist, I. (2004) 'Macronutrients in tree stems and foliage: a comparative study of six temperate forest species planted at the same sites', *Annals of Forest Science*, 61, pp. 489-498. doi: 10.1051/forest.
- Hagen-Thorn, A. and Stjernquist, I. (2005) 'Micronutrient levels in some temperate European tree species: A comparative field study', *Trees - Structure and Function*, 19(5), pp. 572-579. doi: 10.1007/s00468-005-0416-5.
- Halmschlager, E. and Kirisits, T. (2008) 'First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria', *Plant Pathology*, 57(6), p. 1177. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01924.x.
- Hampe, A. and Petit, R. J. (2005) 'Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters', *Ecology Letters*, pp. 461-467. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00739.x.
- Harapin, M., (1991) Značaj biotičkih faktora u procesu sušenja šuma. *Šumarski list* 115 (3-5): 193-202.
- Hauptman, T., (2013) Značilnosti gljive *Chalara fraxinea* in možnosti zatiranja jasenovega ožiga. *Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani*.
- Hauptman, T., Ogris, N., de Groot, M., Piškur, B. and Jurc, D. (2016) 'Individual resistance of *Fraxinus angustifolia* clones to ash dieback', *Forest Pathology*, 46(4), pp. 269-280. doi: 10.1111/efp.12253.
- Hauptman, T., Skudnik, M., Jurc, D., (2012) Ash dieback in Slovenia: ash damage at ash seed collecting stands. *Wood* 64, 129-135.
- Hauptman, T., Piškur, B., de Groot, M., Ogris, N., Ferlan, M. and Jurc, D. (2013) 'Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method', *Forest Pathology*, (May 2005), p. n/a-n/a. doi: 10.1111/efp.12038.
- Hawksworth D.L., (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432
- Hedrick, P.W., (2000) Genetics of populations, 2nd edn. Jones and Bartlet, Boston, MA

- Hietala, A. M. and Solheim, H. (2011) 'Hymenoscyphus species associated with European ash', EPPO Bulletin, (1431), pp. 3–6.
- Hietala, A. M., Timmermann, V., Børja, I. and Solheim, H. (2013) 'The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence', *Fungal Ecology*, 6(4), pp. 302–308. doi: 10.1016/j.funeco.2013.03.008.
- Hillman, B.I., Cai, G., (2013) The family Narnaviridae: simplest of RNA viruses. In: Ghabrial, S.A. (Ed.), *Advances in Virus Research*, vol. 86: Mycoviruses, pp. 149–176.
- Hofmeister, J., Mihaljevič, M. and Hošek, J. (2004) 'The spread of ash (*Fraxinus excelsior*) in some European oak forests: An effect of nitrogen deposition or successional change?', *Forest Ecology and Management*, 203(1–3), pp. 35–47. doi: 10.1016/j.foreco.2004.07.069.
- Holb, I. J., Lakatos, P. and Abonyi, F. (2010) 'Some aspects of disease management of cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii*) with special reference to pesticide use', *International Journal of Horticultural Science*, 16(1), pp. 45–49.
- Hong, Y., Dover, S. L., Cole, T. E., Brasier, C. M. and Buck, K. W. (1999a) 'Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch Elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*.' *Virology*, 258(1), pp. 118–27. doi: 10.1006/viro.1999.9691.
- Hong, Y., Dover, S. L., Cole, T. E., Brasier, C. M. and Buck, K. W. (1999b) 'Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch Elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*.' *Virology*, 258(1), pp. 118–127. doi: 10.1006/viro.1999.9691.
- Hopkin, A.A., McKenney, D.W., (1995) The distribution and significance of scleroderris disease in Ontario. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste. Marie, Ontario. NODA/NFP Technical Report TR-7. pp. 11.
- Howell, C.R. R. and Stipanovic, R.D. D. (1994) 'Effect of sterol biosynthesis inhibitors on phytotoxin (viridiol) production by *Gliocladium virens* in culture', *Phytopathology*, 84(9), pp. 969–972.

- Howitt, R.L., Beever, R.E., Pearson, M.N., Forster, R.L., 1995. Presence of double- stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*. 99, 1472–1478.
- Huber, L. and Gillespie, T. J. (1992) ‘Modeling Leaf Wetness in Relation to Plant Disease Epidemiology’, *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), pp. 553–577. doi: 10.1146/annurev.py.30.090192.003005.
- Husson, C., Caël, O., Grandjean, J. P., Nageleisen, L. M. and Marçais, B. (2012) ‘Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs’, *Plant Pathology*, 61(5), pp. 889–895. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02578.x.
- Husson, C., Scala, B., Caël, O., Frey, P., Feau, N., Ioos, R. and Marçais, B. (2011) ‘*Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France’, *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), pp. 311–324. doi: 10.1007/s10658-011-9755-9.
- Hutchinson, C. M. (1999) ‘*Trichoderma virens*-Inoculated Composted Chicken Manure for Biological Weed Control’, *Biological Control*, 16(2), pp. 217–222. doi: 10.1006/bcon.1999.0759.
- Idnurm, A. and Heitman, J. (2005) ‘Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom’, *PLoS Biology*, 3(4), pp. 0615–0626. doi: 10.1371/journal.pbio.0030095.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S. and Johnson, D. L. (1995) ‘Influence of Ultraviolet Light Protectants on Persistence of the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*’, *Biological Control*, 5(4), pp. 581–590. doi: 10.1006/bcon.1995.1069.
- Ioos, R., Kowalski, T., Husson, C. and Holdenrieder, O. (2009) ‘Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe’, *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), pp. 329–335. doi: 10.1007/s10658-009-9471-x.
- IPCC (2007) ‘Climate change 2007: the physical science basis’, Intergovernmental Panel on Climate Change, 446(7137), pp. 727–8. doi: 10.1038/446727a.
- Ishida, H., Nahara, Y., Tamamoto, M. and Hamada, T. (1991) ‘The fungicidal effect of ultraviolet light on impression materials’, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 65(4), pp. 532–535. doi: 10.1016/0022-3913(91)90295-8.

- ISO 10694, (1995) 'Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)', ISO, Geneve.
- ISO 13878, (1998) 'Soil quality – Determination of total nitrogen content by dry combustion (elemental analysis)', ISO, Geneve.
- Ivić, D., (2010) Curative and eradivative effects of fungicides. In: Carisse, O. (Ed.), *Fungicides. InTech Europe*, Rijeka, Croatia, pp. 3–21
- James, T. Y., Porter, D., Hamrick, J. L. and Vilgalys, R. (1999) 'Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom, *Schizophyllum commune*', *Evolution*, 53(6), pp. 1665–1677. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2640430>.
- James Downer, A., Uchida, J. Y., Hodel, D. R. and Elliott, M. L. (2009) 'Lethal palm diseases common in the United States', *HortTechnology*, 19(4), pp. 710–716.
- Jankovský, L. and Holdenrieder, O. (2009) 'Short communication *Chalara fraxinea* - Ash dieback in the Czech Republic', *Plant Protection Science*, 45(2), pp. 74–78. doi: 10.1111/j.1460-6984.2012.00196.x.
- Johansson, S. M., Pratt, J. E. and Asiegbu, F. O. (2002) 'Treatment of Norway spruce and Scots pine stumps with urea against the root and butt rot fungus *Heterobasidion annosum* - Possible modes of action', *Forest Ecology and Management*, 157(1–3), pp. 87–100. doi: 10.1016/S0378-1127(00)00661-7.
- Johansson, S. B. K., Vasaitis, R., Ihrmark, K., Barklund, P. and Stenlid, J. (2010) Detection of *Chalara fraxinea* from tissue of *Fraxinus excelsior* using species-specific ITS primers. *Forest Pathology*, 40: 111–115. doi:10.1111/j.1439-0329.2009.00614.x
- Junker, C., Mandey, F., Pais, a., Ebel, R. and Schulz, B. (2014) '*Hymenoscyphus pseudoalbidus* and *Hymenoscyphus albidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate', *Forest Pathology*, 44(1), pp. 39–44. doi: 10.1111/efp.12066.
- Juodvalkis, A., Vasiliauskas, A. (2002) The extent and possible causes of dieback of ash stands in Lithuania. *LŽUU Mokslo Darbai, Biomedicinos Mokslai*, 56, 17-22.
- Jurc, D., (2009) Kaj se dogaja z jasenom pri nas? *Gozdarski vestnik*, 66, 4: 211-211.
- Jurc, D., (2000) Obvladovanje najpomembnejših bolezni v gozdnih drvesnicah. *Gozdarski vestnik*, 58, 9: 370-376.

- Jurc, D., Ogris, N., (2008) Kaj se dogaja z jasenom pri nas? *Gozdarski vestnik*, 66, 4: 211-211.
- Kandler, O., (1988) 'Epidemiologische Bewertung der Waldschadenserhebungen 1983 bis 1987 in der Bundesrepublik Deutschland'. *Allg. Forst- Jagdtztg.* 159, pp. 179–194.
- Kenigšvalde, K., Arhipova, N., Laiviņš, M. and Gaitnieks, T. (2010) 'Ošu audžu bojāeju izraisošā sēne *Chalara fraxinea* Latvijā', 21(54), pp. 110–120.
- Keßler, M., Cech, T., Brandstetter, M. and Kirisits, T. (2012) 'Dieback of ash (*Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*) in Eastern Austria: Disease development on monitoring plots from 2007 to 2010', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9), pp. 223–226. doi: 10.5897/JAERD12.055.
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E.M., Adams, J., Carstens, E.B., (2012) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA.
- Kirisits, T. (2012) 'Ash dieback associated with *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9), pp. 230–235. doi: 10.5897/JAERD12.057.
- Kirisits, T., Cech, T.L., (2009) Observations on the sexual stage of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* in Austria. *Forstschutz Aktuell*, 48: 21-25.
- Kirisits, T., Dämpfle, L. and Kräutler, K. (2013) '*Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media', *Forest Pathology*, 1103, p. n/a-n/a. doi: 10.1111/efp.12042.
- Kirisits, T. and Freinschlag, C. (2012) 'Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9), pp. 184–191. doi: 10.5897/JAERD12.057.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-kroupa, S., Halmschlager, E., (2008) Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich?, *Forstschutz Aktuell*, 43: 29-34.

- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-kroupa, S., Cech, T. L. and Halmschlager, E. (2009) 'The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria', *SDU Faculty of Forestry Journal*, (Special Issue), pp. 97–119.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E. and Lakatos, F. (2010) '*Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*)', *Plant Pathology*, 59(2), p. 411. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02162.x.
- Kirisits, T. and Schwanda, K. (2015) 'First definite report of natural infection of *Fraxinus ornus* by *Hymenoscyphus fraxineus*', *Forest Pathology*, 45(5), pp. 430–432. doi: 10.1111/efp.12211.
- Kjær, E. D., McKinney, L. V., Nielsen, L. R., Hansen, L. N. and Hansen, J. K. (2012) 'Adaptive potential of ash (*Fraxinus excelsior*) populations against the novel emerging pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*', *Evolutionary Applications*, 5(3), pp. 219–228. doi: 10.1111/j.1752-4571.2011.00222.x.
- Knudsen, I. M. B., Thomsen, K. A., Jensen, B. and Poulsen, K. M. (2004) 'Effects of hot water treatment, biocontrol agents, disinfectants and a fungicide on storability of English oak acorns and control of the pathogen, *Ciboria batschiana*', *Forest Pathology*, 34(1), pp. 47–64. doi: 10.1046/j.1439-0329.2003.00348.x.
- Koch, K.A., Quiram, G.L., Venette, R.C., (2010) A review of oak wilt management: a summary of treatment options and their efficacy. *Urban For. Urban Green*. 9 (1), 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ufug.2009.11.004>.
- Koltay, A., Szabó, I. and Janik, G. (2012) '*Chalara fraxinea* incidence in Hungarian ash (*Fraxinus excelsior*) forests', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9), pp. 236–238. doi: 10.5897/JAERD12.058.
- Kopinga, J., de Vries, S., (2013) Differences in susceptibility to *Chalara fraxinea* (twig dieback of ash) of selections of common ash (*Fraxinus excelsior*) in the Netherlands – Report of the observations and results of 2012. Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN), Wageningen.
- Kowalski, T. (2006) '*Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland', *Forest Pathology*, 36(4), pp. 264–270. doi: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.



- Kowalski, T., (2009) Rozprzestrzenienie grzyba *Chalara fraxinea* w aspekcie procesu chorobowego jesionu w Polsce. / Expanse of *Chalara fraxinea* fungus in terms of ash dieback in Poland. *Sylvan*, 10: 668-674.
- Kowalski, T. and Bartnik, C. (2010) 'Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure', *Acta Agrobotanica*, 63(1), pp. 99-106. doi: 10.5586/aa.2010.012.
- Kowalski, T. and Holdenrieder, O. (2008) 'Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa | A new fungal disease of ash in Europe', *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, 159(3), pp. 45–50. doi: 10.3188/szf.2008.0045.
- Kowalski, T. and Holdenrieder, O. (2009a) 'Pathogenicity of *Chalara fraxinea*', *Forest Pathology*, 39(1), pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00565.x.
- Kowalski, T. and Holdenrieder, O. (2009b) 'The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback', *Forest Pathology*, 39(5), pp. 304–308. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x.
- Kowalski, T., Kraj, W. and Szeszycki, T. (2012) 'Badania nad zamieraniem jesionu w drzewostanach nadleśnictwa Rokita', *Acta Agraria Et Silvicultura Series Silvestris*, L, pp. 3–21.
- Kowalski, T., Lukomska, A., (2005) Badania nad zamieraniem jasionu (*Fraxinus excelsior* L.) w drzewostanach Nadlesnictwa Włoszczowa. *Acta Agrobotanica*, 58: 429-440.
- Kraj, W. (2009) 'Differentiation and genetic structure of *Sclerophoma pythiophila* strains on pinus sylvestris in Poland', *Journal of Phytopathology*, 157(7–8), pp. 400–406. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01497.x.
- Kraj W, Kowalski T (2008) Genetic variation in Polish strains of *Gremmeniella abietina*. *Forest Pathology*, 38: 203–217
- Kraj, W., Kowalski, T. (2014) 'Genetic variability of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on ash leaf rachises in leaf litter of forest stands in Poland', *Journal of Phytopathology*, 162(4), pp. 218–227. doi: 10.1111/jph.12173.

- Kraj, W., Zarek, M. and Kowalski, T. (2012) 'Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.)', *Mycological Progress*, 11(1), pp. 37–45. doi: 10.1007/s11557-010-0724-z.
- Kräutler, K. and Kirisits, T. (2012) 'The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.)', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9), pp. 261–265. doi: 10.5897/JAERD12.065.
- Kräutler, K., Treitler, R. and Kirisits, T. (2015) *Hymenoscyphus fraxineus* can directly infect intact current-year shoots of *Fraxinus excelsior* and artificially exposed leaf scars. *Forest Pathology*, 45: 274–280. doi:10.1111/efp.12168
- Kunca, A., Leontovyč, R., Zúbrik, M. and Gubka, A. (2011) 'Bark beetle outbreak on weakened ash trees and applied control measures<sup>1</sup>', *EPPO Bulletin*, 41(1), pp. 11–13. doi: 10.1111/j.1365-2338.2010.02428.x.
- Landeweert, R., Veenman, C., Kuyper, T. W., Fritze, H., Wernars, K. and Smit, E. (2003) 'Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques', *FEMS Microbiology Ecology*, 45(3), pp. 283–292. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00163-6.
- Lee, N., Bakkeren, G., Wong, K., Sherwood, J. E. and Kronstad, J. W. (1999) 'The mating-type and pathogenicity locus of the fungus *Ustilago hordei* spans a 500-kb region', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), pp. 15026–15031. doi: 10.1073/pnas.96.26.15026.
- Lindner, M., Maroschek, M., Netherer, S., Kremer, A., Barbati, A., Garcia-Gonzalo, J., Seidl, R., Delzon, S., Corona, P., Kolström, M., Lexer, M. J. and Marchetti, M. (2010) 'Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems', *Forest Ecology and Management*, 259(4), pp. 698–709. doi: 10.1016/j.foreco.2009.09.023.
- Lurie, S. (1998) 'Postharvest heat treatments', *Postharvest Biology and Technology*, pp. 257–269. doi: 10.1016/S0925-5214(98)00045-3.
- Lygis, V., Bakys, R., Vasaitis, R., (2009) Ash decline in Lithuania: the current situation and research. SNS Workshop, Network of Climate Change Risk on Forests. Tvärminne, Finland: pp. 23.

- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K.-H. and Stenlid, J. (2006) 'Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*', *Scandinavian Journal of Forest Research*. Taylor & Francis Group. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02827580510036238#.VmWVAfmrTIU> (Pristupljeno: 31.1.2017.).
- Mahy, B.W.J., Van regenmortel, M.H.V., (2009) Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, Academic press.
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Bailén, G., Guillén, F., Zapata, P. J., Valverde, J. M., Castillo, S., Fuentes, M. and Valero, D. (2008) 'The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage', *Postharvest Biology and Technology*, 47(1), pp. 54–60. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.05.020.
- Maso, E. dal and Montecchio, L. (2014) 'Risk of natural spread of *Hymenoscyphus fraxineus* with environmental niche modelling and ensemble forecasting technique.', *Forest Research: Open Access*, p. 131. doi: 10.4172/21689776.1000131.
- McDonald, B. A. and Linde, C. (2002) 'The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance', in *Euphytica*, pp. 163–180. doi: 10.1023/A:1015678432355.
- McKinney, L. V., Thomsen, I. M., Kjær, E. D., Bengtsson, S. B. K. and Nielsen, L. R. (2012) 'Rapid invasion by an aggressive pathogenic fungus (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) replaces a native decomposer (*Hymenoscyphus albidus*): A case of local cryptic extinction?', *Fungal Ecology*, 5(6), pp. 663–669. doi: 10.1016/j.funeco.2012.05.004.
- McKinney, L. V., Thomsen, I. M., Kjær, E. D. and Nielsen, L. R. (2012) 'Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*', *Forest Pathology*, 42(1), pp. 69–74. doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00725.x.
- McKinney, L. V., Nielsen, L. R., Hansen, J. K. and Kjær, E. D. (2011) 'Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease.', *Heredity*, 106(5), pp. 788–797. doi: 10.1038/hdy.2010.119.

- McKinney, L. V., Nielsen, L. R., Collinge, D. B., Thomsen, I. M., Hansen, J. K., Kjær, E. D., (2014) The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* 63, 485–499.
- Mendgen, K. and Deising, H. (1993) 'Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation', *New Phytologist*, 124(2), pp. 193–213. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03809.x.
- Metzler, B., Junker, C., Lenz, H., Enderle, R., Schultz, B., (2012) Ash dieback: situation and research in Germany. Abstracts of Country Presentations. 1<sup>st</sup> Fraxback meeting, Vilnius, 11. – 16. november 2012. Vilnius, COST: 16-17.
- Milgroom, M. G. and Cortesi, P. (2004) 'Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A Critical Analysis.', *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), pp. 311–338. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325.
- Montecchio, L. (2013) 'A Venturi effect can help cure our trees.', *Journal of visualized experiments: JoVE*, (80), pp. 1–8. doi: 10.3791/51199.
- Mueller-Dombois, D., (1986) Perspectives for an etiology of standlevel dieback. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 221-243.
- Nakamura, H., Ikeda, K., Arakawa, M. and Matsumoto, N. (2002) 'Conidioma production of the white root rot fungus in axenic culture under near-ultraviolet light radiation', *Mycoscience*, 43(3), pp. 251–254. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0037173181&partnerID=40&md5=c8dbe0b4e320c969fa8ec00122442d2a>.
- Narbutas, K., Žuklys, L. (1961) Uosiu vežys miškuose [Ash canker in forest stands]. *Mūsų Girios*, 9, 19-21.
- Nicholson, R. L. (1996) Adhesion of fungal propagules. Significance to the success of the fungal infection process. In: Nicole, M., Gianinazzi – Pearson, V., eds. *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant – Microorganism Interactions*, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 117-134.
- Niinemets, Ü. and Kull, K. (2005) 'Co-limitation of plant primary productivity by nitrogen and phosphorus in a species-rich wooded meadow on calcareous soils', *Acta Oecologica*, 28(3), pp. 345–356. doi: 10.1016/j.actao.2005.06.003.

- Nuss, D. L. (1992) 'Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis.', *Microbiological reviews*, 56(4), pp. 561–76. doi: 10.1099/vir.0.025411-0.
- Nuss, D. L. (2005) 'Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface.', *Nature reviews. Microbiology*, 3(8), pp. 632–42. doi: 10.1038/nrmicro1206.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J.-M. and Vilgalys, R. (2005) 'Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples.', *Applied and environmental microbiology*, 71(9), pp. 5544–50. doi: 10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005.
- Ogris, N., (2008) Jasenov ožig, *Chalara fraxinea*. *Novice iz varstva gozdov*. Ljubljana, Gozdrski inštitut Slovenije, 1: 1-1.
- Ogris, N., (2009) Kaj se dogaja z jasenom pri nas? Drugo nadaljevanje. *Gozdrski vestnik*, 67, 5/6:251-252.
- Ogris, N., Hauptman, T. and Jurc, D. (2009) 'Chalara fraxinea causing common ash dieback newly reported in Slovenia', *Plant Pathology*, p. 1173. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02105.x.
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D., Floreancig, V., Marsich, F. and Montecchio, L. (2010) 'First Report of *Chalara fraxinea* on Common Ash in Italy', *Plant Disease*, 94(1), pp. 133–133. doi: 10.1094/PDIS-94-1-0133A.
- Orlikowski, L. B., Ptaszek, M., Rodziewicz, A., Nechwatal, J., Thinggaard, K. and Jung, T. (2011) 'Phytophthora root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark', *Forest Pathology*, 41(6), pp. 510–519. doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00714.x.
- Özçelik, B. (2007) 'Fungi/bactericidal and static effects of ultraviolet light in 254 and 354 nm wavelengths', *Research Journal of Microbiology*, 2(1), pp. 42–49.
- Parnesan, C. (2006) 'Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change', *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37(May), pp. 637–669. doi: 10.2307/annurev.ecolsys.37.091305.30000024.
- Parnesan, C. and Yohe, G. (2003) 'A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems.', *Nature*, 421(6918), pp. 37–42. doi: 10.1038/nature01286.

- Pautasso, M., Aas, G., Queloz, V. and Holdenrieder, O. (2013) 'European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge', *Biological Conservation*. Elsevier Ltd, 158, pp. 37–49. doi: 10.1016/j.biocon.2012.08.026.
- Pavela, R. and Barnett, M. (2005) 'Systemic applications of neem in the control of *Cameraria ohridella*, a pest of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*)', *Phytoparasitica*, 33(1), pp. 49–56.
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B. and Arthur, K. (2009) 'Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology', *Molecular Plant Pathology*, pp. 115–128. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x.
- Perry, T., Santamour, F., Stipes, R., Shear, T. and Shigo, A. (1991) 'Exploring Alternatives To Tree Injection', *Journal of Arboriculture*, 17(8), pp. 217–226.
- Petit, R. J., Aguinalalde, I., de Beaulieu, J.-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S. and Vendramin, G. G. (2003) 'Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity.', *Science* (New York, N.Y.), 300(5625), pp. 1563–1565. doi: 10.1126/science.1083264.
- Petit, R. J., Hampe, A. and Cheddadi, R. (2005) 'Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean', *Taxon*, pp. 877–885. doi: 10.2307/25065474.
- Pham, T. L. H., Zaspel, I., Schuemann, M., Stephanowitz, H. and Krause, E. (2013) 'Rapid in-vitro and in-vivo detection of *Chalara fraxinea* by means of mass spectrometric techniques.', *Special issue on biointeractions and plant health.*, pp. 444–453. doi: 10.4236/ajps.2013.42A057.
- Piškur, B., (2010) Kaj se dogaja z jasenom pri nas? Četrto nadaljevanje. *Gozdarski vestnik*, 68, 5/6: 340-344.
- Pliura, A., Lygis, V., Gustiene, A., Marčiulyniene, D., Suchckas, V., (2012) Situation with ash in Lithuania: stand characteristics, health conditions, ongoing work and research needs. Abstracts of Country Presentations. 1<sup>st</sup> Fraxback meeting, Vilnius, 11. – 16. november 2012. Vilnius, COST: 21-23.
- Pliûra, A., Lygis, V., Suchockas, V. and Bartkevièius, E. (2011) 'Performance of Twenty Four European *Fraxinus excelsior* Populations in Three Lithuanian Progeny Trials

- with a Special Emphasis on Resistance to *Chalara fraxinea*', *Baltic Forestry*, 17(1), pp. 17–34.
- Pliūra, A., Marēiulynienė, D., Bakys, R. and Suchockas, V. (2014) 'Dynamics of Genetic Resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Juvenile *Fraxinus excelsior* Clones', *Baltic Forestry*, (2012), pp. 10–27.
- Polak, T., Rock, B.N., Campbell P.E., Soukupova, J., Solcova, B., Zvara, K., Albrechtova, J., (2006) 'Shoot growth processes, assessed by bud development types, reflect Norway spruce vitality and sink prioritization'. *Forest Ecology and Management* Vol. 225 (1-3): 337-348.
- Polanco, L., Rodrigues, F. A., Moreira, E., Duarte, H., Cacique, I., Valente, L., Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J. and Vale, F. (2013) 'Management of anthracnose in common bean by foliar spraying of potassium silicate, sodium molybdate and fungicide', *Plant Disease*, 98(1), p. 130731135532006. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0251-RE.
- Polashock, J. J., Bedker, P. J. and Hillman, B. I. (1997) 'Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: Ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination', *Molecular and General Genetics*, 256(5), pp. 566–571. doi: 10.1007/s004380050602.
- Polashock, J. J., Bedker, P. J. and Hillman, B. I. (1997) 'Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination.', *Molecular & general genetics : MGG*, 256(5), pp. 566–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413441> (Pristupljeno 15.1.2017.).
- Polashock, J. J. and Hillman, B. I. (1994) 'A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), pp. 8680–8684. doi: 10.1073/pnas.91.18.8680.
- Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja (2017) Ministarstvo poljoprivrede RH [<https://fis.mps.hr/trazilicaszb/#>], pristupljeno 12.1.2017.

- Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Lacković, N., (2016) Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske – izvješće za 2015. godinu. *Nacionalni koordinacijski centar za procjenu i motrenje utjecaja atmosferskog onečišćenja i drugih čimbenika na šumske ekosustave, Hrvatski šumarski institut*, Jastrebarsko, 1 – 124.
- Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Lacković, N., Ognjenović, M., Laslo, A., (2017) Oštećenost šumskih ekosustava Republike Hrvatske – izvješće za 2016. godinu. *Nacionalni koordinacijski centar za procjenu i motrenje utjecaja atmosferskog onečišćenja i drugih čimbenika na šumske ekosustave, Hrvatski šumarski institut*, Jastrebarsko, 1 – 124.
- Pravilnik o provenijencijama svojti šumskog drveća (2011) Narodne novine NN 147/2011. [[http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011\\_12\\_147\\_2987.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_12_147_2987.html)], pristupljeno 21.3.2017.
- Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o provenijencijama svojti šumskog drveća (2012) Narodne novine NN 96/2012. [[http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012\\_08\\_96\\_2157.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_08_96_2157.html)], pristupljeno 21.3.2017.
- Pravilnik o načinu motrenja oštećenosti šumskih ekosustava, (2013) Narodne novine NN 76/2013. [[http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_06\\_76\\_1546.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1546.html)], pristupljeno 21.3.2017.
- Prospero, S., Rigling, D., 2013: Chestnut Blight. In: Gonthier, P., Nicolotti, G., (Eds.), *Infectious Forest Diseases*. CAB International, Wallingford (UK), pp. 318-339.
- Prpić, B., Seletković, Z., Ivkov, M., (1991) Propadanje šuma u Hrvatskoj i odnos pojave prema biotskim i abiotskim činiteljima danas i u prošlosti. *Šumarski list* 115 (3–5): 107–129.
- Przybył, B. K. (2002) 'Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots', 32, pp. 387–394.
- Pukacki, P. M. and Przybył, K. (2005) 'Frost injury as a possible inciting factor in bud and shoot necroses of *Fraxinus excelsior* L.', *Journal of Phytopathology*, 153(9), pp. 512–516. doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.01010.x.



- Qualls, R. G. and Johnson, J. D. (1983) 'Bioassay and dose measurement in UV disinfection.', *Applied and environmental microbiology*, 45(3), pp. 872–877.
- Queloz, V., Grünig, C. R., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T. N. and Holdenrieder, O. (2011a) 'Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*', *Forest Pathology*, 41(2), pp. 133–142. doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. and Collado, I. G. (2007) 'Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*', *Phytochemistry Reviews*, 7(1), pp. 89–123. doi: 10.1007/s11101-006-9032-2.
- Rigling, H. and (1994) 'Biological Control of Chestnut Blight in Europe', *Annual review of phytopathology*, 215(4532), pp. 466–471. doi: 10.1126/science.215.4532.466.
- Rodriguez-Garcia, C., Medina, V., Alonso, A. and Ayllon, M. A. (2014) 'Mycoviruses of *Botrytis cinerea* isolates from different hosts', *Annals Of Applied Biology*, 164(1), pp. 46–61. doi: 10.1111/aab.12073.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtkke, M., Kastner, C., Müller, S. and Fischer, R. (2010) 'Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light Makes a Difference', *Annual Review of Microbiology*, 64(1), pp. 585–610. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134000.
- Rytkönen, A., Lilja, A., Drenkhan, R., Gaitnieks, T. and Hantula, J. (2011) 'First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia', *Forest Pathology*, 41(3), pp. 169–174. doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00647.x.
- Santamaría, O., González, M. A., Pajares, J. A. and Diez, J. J. (2007) 'Effect of fungicides, endophytes and fungal filtrates on in vitro growth of Spanish isolates of *Gremmeniella abietina*', *Forest Pathology*, 37(4), pp. 251–262. doi: 10.1111/j.1439-0329.2007.00498.x.
- Santini, A., Ghelardini, L., Pace, C. De, Capretti, P., Chandelier, A., Cech, T. and Chira, D. (2013) 'Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe', *New Phytologist*, 197, pp. 238–250. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04364.x
- Schoebel, C. N., Zoller, S. and Rigling, D. (2014) 'Detection and genetic characterisation of a novel mycovirus in *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback.',

- Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, pp. 78–86. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.001.
- Schoenen, D. and Kolch, A. (1992) 'Photoreactivation of *E. coli* depending on light intensity after UV irradiation.', *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*, 192(6), pp. 565–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1575883>. Pristupljeno 15.1.2017.
- Schroder, T., (2002) On the geographic variation of *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald, the main pathogenic fungus on acorns of *Quercus robur* and *Q. Petraea* in Europe. *Dendrobiology*, 47: 13-19.
- Schröder, T., Dujesiefken, D., (2001) Typische Schadsymptome an Baumarten: Krankheiten und Schäden der Esche. *AFZ-Der-Wald, Allgemeine Forst Zeitsch. Für Waldwirts. Und Umwelt forsch* 56, 276-279.
- Schumacher, J., Kehr, R. and Leonhard, S. (2010) 'Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*', *Forest Pathology*, 40(5), pp. 419–429. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00615.x.
- Schumacher, J., Wulf, A. and Leonhard, S. (2007) 'First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany - a new agent of ash decline.', *Erster Nachweis von Chalara fraxinea T. Kowalski sp. nov. in Deutschland - ein Verursacher neuartiger Schaden an Eschen.*, pp. 121–123.
- Schwanda, K. and Kirisits, T. (2016) 'Pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* towards leaves of three European ash species: *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus*', *Plant Pathology*, 65(7), pp. 1071–1083. doi: 10.1111/ppa.12499.
- Seifert, K. (2009) 'Progress towards DNA barcoding of fungi', *Molecular Ecology Resources*, 9(1), pp. 83–89. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x.
- Singh, G, Dyer, P.S., Ashby, A.M., (1999) Intra-specific and inter-specific conservation of mating-type genes from the discomycete plant-pathogenic fungi *Pyrenopeziza brassicae* and *Tapesia yallundae*. *Current Genetics* 36, 290-300.
- Skilling, D. D., Schneider, B. S. and Podolski, T. B. (1984) 'Testing Fungicides for Control of *Gremmeniella abietina* in New York', in Manion, P. D. (ed.) *Scleroderris canker of*

- conifers: Proceedings of an international symposium on scleroderris canker of conifers, held in Syracuse, USA, June 21--24, 1983. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 212–216. doi: 10.1007/978-94-009-6107-4\_35.
- Skovsgaard, J. P., Thomsen, I. M., Skovsgaard, I. M. and Martinussen, T. (2010) ‘Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.)’, *Forest Pathology*, 40(1), pp. 7–18. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00599.x.
- Smitley, D.R., Doccia, J.J., Cox, D.L., (2010) Multiple-year protection of ash trees from emerald ash borer with a single trunk injection of emamectin benzoate and single-year protection with an imidacloprid basal drench. *Arboric. Urban Forestry* 36 (5), 206–211.
- Solheim, H., Timmermann, V., Børja, I., Hietala, A.M., (2011) A small ascomycete, *Hymenoscyphus fraxineus*, is a threat to common ash in Europe. *Agarica*, 30: 82-88.
- Spaić, I, (1955) Problematika zaštite šuma u NR Hrvatskoj. *Šumarski list* (11 – 12): 84 – 112.
- Speiser, B., Berner, A., Haseli, A. and Tamm, L. (2000) ‘Contro of Downy Mildew of Grapevine with Potassium Phosphonate: Effectivity and Phosphonate Residues in Wine’, *Biological Agriculture and Horticulture*, 17, pp. 305–312. doi: 10.1080/01448765.2000.9754851.
- Steiner, C., Teixeira W.G., Lehmann, J., Cech, W., (2004) Microbial Response to Charcoal Amendments of Highly Weathered Soils and Amazonian Dark Earths in Central Amazonia Preliminary Results. Pages 195- 212 in B. Glaser and W. I. Woods, editors. Amazonian Dark Earths: Explorations in Space and Time. Springer Verlag, Heidelberg.
- Stener, L.G. (2013) ‘Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden’, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 28(3), pp. 205–216. doi: 10.1080/02827581.2012.735699.
- Sutton, D. K., MacHardy, W. E. and Lord, W. G. (2000) ‘Effects of shredding or treating apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup’, *Plant Disease*, 84(12), pp. 1319–1326. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.12.1319.
- Szabó, I. (2009) ‘First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary’, *Plant Pathology*, p. 797. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02032.x.

- Talgo, V., Sletten, A., Brurberg, M. B., Solheim, H. and Stensvand, A. (2009) 'Chalara fraxinea isolated from diseased Ash in Norway', *Disease Notes*, 93(5), p. 548. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00565.x.
- Tanis, S.R., Clegg, B.M., Mota-Sanchez, D., McCullough, D.G., Poland, T.M., (2012) Spatial and temporal distribution of trunk-injected 14C-imidacloprid in *Fraxinus* trees. *Pest Manage. Sci.* 68 (4), 529–536, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2281>.
- Temunović, M. (2013) Utjecaj ekoloških čimbenika na genetičku varijabilnost poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl, OLEACEAE). *Doktorska disertacija. Šumarski fakultet Sveučilište u Zagrebu*.
- Thomsen, I.M., Skovsgaard, J.P., Barklund, P., Vasaitis, R., (2007) Svampesygdom er årsag til toptørre i ask = A fungal disease is the cause of ash dieback. *Skoven*, 5: 234-236.
- Tikvić, I., Seletković, Z., (2004) Propadanje stabala i poremetnja stabilnosti nizinskih šumskih ekosustava. *Bilten parka prirode Lonjsko polje*, 6(2): 58-67.
- Timmermann, V., Børja, I., Hietala, A. M., Kirisits, T. and Solheim, H. (2011) 'Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway\*', *EPPO Bulletin*, 41(1), pp. 14–20. doi: 10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x.
- Tisch, D. and Schmoll, M. (2010) 'Light regulation of metabolic pathways in fungi', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1259–1277. doi: 10.1007/s00253-009-2320-1.
- Topić, J., Vukelić, J., (2009) Priručnik za određivanje kopnenih staništa u Hrvatskoj prema direktivi o staništima EU. *Zagreb: Državni zavod za zaštitu prirode*, 376.
- Uotila, A., Kurkela, T., Tuomivirta, T., Hantula, J., Kaitera, J., (2006) *Gremmeniella abietina* types cannot be distinguished using ascospore morphology. *Forest Pathology* 36: 395–405.
- Valero, A., Begum, M., Leong, S. L., Hocking, A. D., Ramos, A. J., Sanchis, V. and Marín, S. (2007) 'Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins', *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), pp. 238–243. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x.
- Van den Burg, J., (1985) Foliar analysis for determination of tree nutrient status - a compilation of literature data (1. up to 1984). Rapport No. 414, Rijksinstituut voor

- onderzoek in de bosen landschapbouw (Institut for Forestry and Urban Ecology) “De Dorsch- amp”. Wageningen, The Netherlands
- Van den Burg, J., (1990) Folia analysis for determination of tree nutrient status - a compilation of literature data (2. 1985–1990). Rapport No. 591, Rijksinstituut voor onderzoek in de bos-en landschapbouw (Institut for Forestry and Urban Ecology) “De Dorsch- amp”. Wageningen, The Netherlands
- Waite, H. and May, P. (2005) ‘The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars’, *Phytopathologia Mediterranea*, 44(2), pp. 144–152.
- Waite, H. and Morton, L. (2007) ‘Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material’, *Phytopathologia Mediterranea*, pp. 5–17.
- Wallander, E., (2008) Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*, 273, 25–49.
- Wallbank, A.M., Lebtog, I., Meyer, W. and Boehm, P. (1985) ‘Inactivation of bacteria and viruses in water: passage of germicidal ultraviolet light through Teflon.’, *Laboratory Animals*, 19(4), pp. 273–274. doi: 10.1258/002367785780887374.
- Wang, X. R. (1997) ‘Genetic variability in the canker pathogen fungus, *Gremmeniella abietina*. Contribution of sexual compared with asexual reproduction’, *Mycological Research*, 101, pp. 1195–1201. doi: Doi 10.1017/S0953756297003791.
- Waser L.T., Kuchler M, Jütte K, Stampfer T. (2014) 'Evaluating the Potential of WorldView-2 Data to Classify Tree Species and Different Levels of Ash Mortality'. *Remote Sensing* 6(5):4515-4545.
- Weber, G., Bahr, B., (2000) Wachstum und Ernährungszustand junger Eschen (*Fraxinus excelsior* L.) und Bergahorne (*Acer pseudoplatanus* L.) auf SturmwurZächen in Bayern in Abhängigkeit vom Standort. *Forstw Cbl* 119:177–192
- Weber-Blaschke, G., Heitz, R., Blaschke, M. and Ammer, C. (2008) ‘Growth and nutrition of young European ash (*Fraxinus excelsior* L.) and sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.) on sites with different nutrient and water statuses’, *European Journal of Forest Research*, 127(6), pp. 465–479. doi: 10.1007/s10342-008-0230-x.

- Van Wees, S. C. M., Van der Ent, S. and Pieterse, C. M. J. (2008) 'Plant immune responses triggered by beneficial microbes.', *Current opinion in plant biology*, 11(4), pp. 443–8. doi: 10.1016/j.pbi.2008.05.005.
- White, T. J., Bruns, S., Lee, S. and Taylor, J. (1990) 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics', *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. doi: citeulike-article-id:671166.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics', in MA, I., DH, G., JJ, S., and White, T. (eds) *PCR Protocols: A Guides to Methods and Applications*. New York: Academic Press, pp. 315–322.
- Wright, J. R., Sumner, S. S., Hackney, C. R., Pierson, M. D. and Zoecklein, B. W. (2000) 'Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider.', *Journal of food protection*, 63(5), pp. 563–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826711>.
- Wu, M. D., Zhang, L., Li, G. Q., Jiang, D. H., Hou, M. S. and Huang, H.C. (2007) 'Hypovirulence and Double-Stranded RNA in *Botrytis cinerea*.' , *Phytopathology*, 97(12), pp. 1590–1599. doi: 10.1094/PHYTO-97-12-1590.
- Yin, M. C. and Tsao, S. M. (1999) 'Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species', *International Journal of Food Microbiology*, 49(1–2), pp. 49–56. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00061-6.
- Zaffarano, P.L, Dub. A., Grunig. C.R., (2010) Characterisation of the mating type (MAT) locus in the *Phialocephala fortinii* s.l. - *Acephala applanata* species complex, *Fungal Genet. Biol.* 47, 761 -772.
- Zhan, J., Torriani, S. F. F. and McDonald, B. A. (2007) 'Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*', *Fungal Genetics and Biology*, 44(5), pp. 339–346. doi: 10.1016/j.fgb.2006.10.008.
- Zhao, Y., Hosoya, T., Baral, H.-O., Hosaka, K. and Kakishima, M. (2012) '*Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan', *Mycotaxon*, 122(Kowalski 2006), pp. 25–41. doi: 10.5248/122.25.

Zhou, T. and Boland, G. J. (1997) 'Hypovirulence and Double-Stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*', *Phytopathology*, 87(2), pp. 147–153. doi: 10.1094/phyto.1997.87.2.147.

## 11. ŽIVOTOPIS

Marno Milotić rođen je 26. listopada 1984. godine u Rijeci. Osnovnu školu Vladimir Nazor u Pazinu završava 1999. godine, a opću gimnaziju Juraj Dobrila 2003. godine također u Pazinu. Iste godine upisuje Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 28. lipnja 2010. godine na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje, s diplomskim radom pod naslovom “Razvoj bijelog (*Tuber magnatum* Pico) i crnog tartufa (*Tuber melanosporum* Vitt.) umjetnim uzgojem na sjemenu i sadnicama hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) i obične lijeske (*Corylus avellana* L.)”. U lipnju 2011. godine zapošljava se na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak – asistent na projektu 068-0681966-2775 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa pod nazivom “Biotski čimbenici propadanja šumskog drveća na kršu Hrvatske” (voditelj znanstvenog projekta: prof. dr. sc. Danko Diminić). U akademskoj godini 2011/2012. upisuje poslijediplomski doktorski studij Šumarstvo na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Urbano šumarstvo, zaštita prirode, uređivanje i zaštita šuma.

U svom znanstveno-istraživačkom radu bavi se šumarskom i urbanom fitopatologijom, fitofarmacijom i fitomedicinom, forenzičkom fitopatologijom, zaštitom šuma, zaštitom šuma u zaštićenim urbanim područjima, dijagnostikom i opisom novih ornamentalnih i šumskih biljnih bolesti, odnosima domaćina i parazita, epidemiologijom bolesti, otkrivanjem puteva infekcije i kolonizacije novih patogena, intra i inter vrsnim odnosima patogena, te biološkom i kemijskom kontolom bolesti.

Kao suradnik sudjelovao je na projektima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (pod nazivom “Biotski čimbenici propadanja šumskog drveća na kršu Hrvatske”, te “Štetni biotski čimbenici šumskog i urbanog drveća na kršu Hrvatske”), Ministarstva poljoprivrede (pod nazivom “Integrirana zaštita šumskih ekosustava krša Hrvatske u promijenjenim klimatskim uvjetima”, te “Ekologija i obnova poplavnih šuma Posavine”) i Hrvatske zaklade za znanost (pod nazivom FRAXINPRO “Uloga biotičkih čimbenika na vitalnost poljskoga jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) u poplavnim šumama Hrvatske”). Od 2011. godine aktivno sudjeluje kao suradnik na tri međunarodna projekta COST akcije (European Cooperation in Science and Technology): COST Action FP1102 Determining Invasiveness And Risk Of Dothistroma (DIAROD), COST Action FP1002 Pathway Evaluation and pest Risk



Management In Transport (PERMIT), te COST Action FP1103 *Fraxinus* dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management (FRAXBACK).

Tijekom poslijediplomskog doktorskog studija pohađao je 8 međunarodnih i jednu domaću radionicu za usavršavanje i sudjelovao na 12 međunarodnih i 4 domaće konferencije, te je sudjelovao na međunarodnom usavršavanju STSM Short Term Scientific Mission pod nazivom “Characterization of the isolates of *Hymenoscyphus fraxineus* from Belgium and Croatia”, u Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgija, gdje je znanstvenim usavršavanjem u inozemstvu stekao kompetencije za molekularnu genetičku analizu gljivičnih patogena.

Aktivno se služi engleskim, slovenskim i talijanskim jezikom, a pasivno i španjolskim.

Član je Hrvatskog lovačkog saveza, te Hrvatskog društva biljne zaštite.

## 12. CURRICULUM VITAE

Marno Milotić was born on the 26<sup>th</sup> of October 1984 in Rijeka. He finished elementary school Vladimir Nazor in Pazin (1999), and general high school Juraj Dobrila (2003) also in Pazin. In 2003 he was admitted to the Faculty of Forestry, University of Zagreb, where he graduated on the 28<sup>th</sup> of June 2010 on the Department of Forest Protection and Wildlife Management, with master thesis “Development of white (*Tuber magnatum* Pico) and black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.) by artificial cultivation on seed and seedlings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and common hazel (*Corylus avellana* L.)”. In June 2011 he started working for the Faculty of Forestry, University of Zagreb, as a science novice – assistant on the project of Ministry of science, Education and Sports, entitled “Biotic factors causing declining forest trees in karst area of Croatia” (project leader: Prof.dr.sc. Danko Diminić). In academic year 2011/2012 he entered a postgraduate doctoral program Forestry, at the Faculty of Forestry University of Zagreb, course Urban forestry, nature protection, forest management and forest protection.

In his scientific work he is involved in the field of forest and urban phytopathology, phytofarmacy and phytomedicine, forensic phytopathology, forest protection, urban tree health and protection, diagnostics and description of new ornamental and forest tree diseases, host-parasite interactions, epidemiology, intra and inter species pathogen relations and biological or chemical disease control.

He was a member of the projects of Ministry of Science, Education and Sports (entitled “Biotic factors causing declining forest trees in karst area of Croatia” and “Harmful biotic factors of forest and urban trees on karst ares in Croatia”), Ministry of Agriculture (entitled “Integrated protection of forest ecosystems in karts area in Croatia in modified climatic conditions” and “Ecology and regeneration of lowland forests in Sava river region”) and Croatian Science Foundation (entitled FRAXINPRO “The role of biotic factors on the vitality of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) in Croatian lowland forests”). Since 2011 he is an active member on three international projects of COST Action (European Cooperation in Science and Technology): COST Action FP1102 Determining Invasiveness And Risk Of Dothistroma (DIAROD), COST Action FP1002 Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport (PERMIT), te COST Action FP1103 Fraxinus dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management (FRAXBACK).

During the postgraduate doctoral program he attended 8 international and one domestic scientific Training schools and Workshops, and 12 international and 4 domestic conferences. He also attended an international specialization STSM (Short Term Scientific Mission) entitled “Characterization of the isolates of *Hymenoscyphus fraxineus* from Belgium and Croatia”, in the Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgium, where he acquired competence for molecular genetic analysis of fungal pathogens.

Foreign language proficiency: English (A), Slovenian (A), Italian (B) and Spanish (C).

He is a member of Croatian Hunting Association and Croatian Plant Protection Association.

### 13. ZNANSTVENE AKTIVNOSTI I ZNANSTVENE PUBLIKACIJE AUTORA

#### Objavljeni znanstveni radovi u prvoj skupini referentnih časopisa (a1)

Diminić, D., Kajba, D., **Milotić, M.**, Andrić, I., Kranjec, J., 2017: Susceptibility of *Fraxinus angustifolia* clones to *Hymenoscyphus fraxineus* in lowland Croatia. Baltic forestry. (u postupku objavljivanja)

Andrić, I., Poljak, I., **Milotić, M.**, Idžojić, M., Kajba, D., 2016: Fenološka svojstva listanja poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u klonskoj sjemenskoj plantaži. Šumarski list, 3-4; 117-126.

Pilarska, D., Georgiev, G., Golemansky, V., Pilarski, P., Mirchev, P., Georgieva, M., Tabaković-Tošić, M., Todorov, M., Takov, D., Pernek, M., Hrašovec, B., **Milotić, M.**, Dautbašić, M., Mujezinović, O., Naceski, S., Paparazova-Anakieva, I., Matova, M., Vafeidis, P., 2016: *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Balkan peninsula - an overview. Silva Balcanica, 1; 31-40.

**Milotić, M.**, Mujezinović, O., Dautbašić, M., Trešić, T., Pilarska, D., Diminić, D., 2015: First record of gypsy moth entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, and Soper in Bosnia and Herzegovina. Šumarski list 1-2, 59-67.

Hrašovec, B., Pernek, M., Lukić, I., **Milotić, M.**, Diminić, D., Franjević, M., Hajek, A., Linde, A., Pilarska, D., 2013: First record of the pathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) within an outbreak populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) in Croatia. Periodicum biologorum Vol. 115, No. 3, 379-384.

#### Prezentacija odnosno usmeno izlaganje na međunarodnom znanstvenom skupu

**Milotić, M.**, Kranjec, J., Diminić, D., 2016: Current status of ash dieback disease *Hymenoscyphus fraxineus* in Croatia, Book of abstracts , GREEN 2 Natural resources, green technology & sustainable development 2, Zagreb, Croatia (Oral presentation)

Kranjec, j., Milošić, L., Kolar, A., **Milotić, M.**, Diminić, D., 2016: New insights on Dothistroma needle blight on pine species in Croatia, Book of abstracts, GREEN 2 Natural resources, green technology & sustainable development 2, Zagreb, Croatia (Oral presentation)

Hrašovec, B., **Milotić, M.**, Lukić, I., Franjević, M., Pernek, M., 2013: Prvi nalaz entomopatogene gljive *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) u Hrvatskoj, Društvo za zaštitu bilja u BiH: 10. Simpozijum o zaštiti bilja u BiH, Sarajevo, BiH (Oral presentation)

**Milotić, M.**, Kajba, D., Diminić, D., 2013: Nova bolest jasena (*Fraxinus* spp.) i fenološka motrenja u klonskim sjemenskim plantažama u Hrvatskoj, Društvo za zaštitu bilja u BiH: 10. Simpozijum o zaštiti bilja u BiH, Sarajevo, BiH (Oral presentation)

Diminić, D., Devčić Buzov I., Kranjec, J., **Milotić, M.**, 2015: Research update on *Mycosphaerella dearnessii* Barr. on *Pinus halepensis* Mill. in Croatia, 17th annual meeting of European Mycological Network (EMN), Ljubljana, Slovenija. (oral presentation).

Diminić, D., **Milotić, M.**, Kajba, D., 2014: Ongoing research on ash dieback in Croatia, EMN 17th annual meeting and EPPO 13th workshop on EPPO diagnostic protocols for regulated pests (Fungi), Budapest, Hungary, 6 - 9 May 2014 (Oral presentation)

#### **Poster na međunarodnom znanstvenom skupu**

Zgrablić, Ž., **Milotić, M.**, Grebenc, T., 2014: Truffles in Istria: An overview of their importance for people and ecology, HYPOGES 2 And TAUESG 5, Rabat - Morocco (Poster)

**Milotić, M.**, Kajba, D., Diminić, D., 2013: Phenological differences in clonal seed orchards of non – infected narrow leaf ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) - monitoring *Chalara fraxinea*, COST Action FP1103 FRAXBACK 4th MC Meeting & Workshop “Frontiers in ash dieback research”, Sankt Gertrud Konferens, Malmö, Sweden (Poster)

**Milotić, M.**, Barić, L., Diminić, D., 2012: The role of fungi in holm oak (*Quercus ilex* L.) crown dieback in Croatia, Book of abstracts, IUFRO Conference: Forests for cities, forests for people - Perspectives on urban forest governance, Zagreb, Croatia (Poster)

**Milotić, M.**, Barić, L., Diminić, D., 2012: Fungi associated with crown dieback of holm oak (*Quercus ilex* L.) in Croatia, 15th Annual Meeting of European Mycological Network and 11th Workshop on EPPO Diagnostic Protocols for Regulated Pests (Fungi), Torun, Poland (Poster)

### **Prezentacija odnosno usmeno izlaganje na domaćem znanstvenom skupu**

**Milotić, M.,** Kranjec, J., Damić, M., Diminić, D., 2017: Parametri rasta i fruktifikacija izolata gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya prilikom izloženosti djelovanju ultravioletnih zraka svjetlosti. Glasilo biljne zaštite, Zbornik sažetaka 61. seminara biljne zaštite, Opatija, Croatia (Usmena prezentacija)

Kranjec, J., **Milotić, M.,** Milošić, L., Kolar, A., Diminić, D., 2017: Istraživanje uzročnika crvene pjegavosti borovih iglica (*Dothistroma* spp.) na području Istre te šumarije Đurđevac. Glasilo biljne zaštite, Zbornik sažetaka 61. seminara biljne zaštite, Opatija, Croatia (Usmena prezentacija)

Kranjec, J., **Milotić, M.,** Diminić, D., 2016: Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u posavskim nizinskim šumama Hrvatske, FRAXINPRO HRZZ radionica, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. (Usmena prezentacija)

**Milotić, M.,** Kranjec, J., Diminić, D., 2016: Morfološka i genetička obilježja te patogenost gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya kao uzročnik odumiranja poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) u Hrvatskoj, FRAXINPRO HRZZ radionica, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. (Usmena prezentacija)

**Milotić, M.,** Diminić, D., 2015: Uloga fitopatogenih gljiva na sušenje hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) u Hrvatskoj, Glasilo biljne zaštite, Zbornik sažetaka 59. seminara biljne zaštite, Opatija, Croatia (Usmena prezentacija)

**Milotić, M.,** Kajba, D., Diminić, D., 2014: Fenološka motrenja u klonskim sjemenskim plantažama u Hrvatskoj s obzirom na zarazu gljivom *Chalara fraxinea*, Glasilo biljne zaštite, Zbornik sažetaka 58. seminara biljne zaštite, Opatija, Croatia (Usmena prezentacija)

### **Poster na domaćem znanstvenom skupu**

**Milotić, M.,** 2016: Uloga gljive *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u odumiranju jasena (*Fraxinus* spp.) u Hrvatskoj, proceedings Dan doktorata 2016, Faculty of Forestry University of Zagreb (poster)

### **Znanstveno usavršavanje u inozemstvu (do 1 mj.)**

EUFORINNO Summer school of scientific writing and publishing, Gozdarski Inštitut Slovenije, Pokljuka, Slovenija, 18.-22.8.2014.

EU COST Training School 2014: Identification and molecular detection of invasive alien species (IAS) in forest ecosystem, FP1002 PERMIT (Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport) in Forest Research Institute, Sękocin Stary (Warsaw), Poland, 08.-10.7.2014.

EU COST Training School 2013: Field and laboratory methods for detection of invasive pests and pathogens, FP1002 PERMIT (Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport) in Sarajevo, 01.-05.7.2013.

EU COST Training School 2012: Training School on Detection and Diagnosis of Dothistroma Needle Blight, COST Action FP1102 DIAROD Mendel University in Brno, Czech Republic, 21.-25.5.2012.

### **Znanstveno usavršavanje u inozemstvu (1-3 mj.)**

STSM Short Term Scientific Mission pod nazivom “Characterization of the isolates of *Hymenoscyphus fraxineus* from Belgium and Croatia”, u Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgija, 30.10.2015. – 01.12.2015.